



細菌叢研究 グループ 報告会

第1回

報告概要・資料集

9月4日 [水]
18:00~19:00
学I講堂

司会：口腔外科学教室 教授 植野高章

開会のご挨拶：大槻 勝紀 学長

座長：一般消化器外科学教室 特別任命教員教授 田中 慶太郎

1) 『全身状態と口腔内細菌叢、腸内細菌叢の関連』

口腔外科学教室 教授 植野 高章
小越 菜保子
大森 実知

2) 『循環器内科疾患患者の口腔内細菌叢の評価』

内科学Ⅲ教室（循環器内科）専門教授 星賀 正明
衛生学・公衆衛生学教室 教授 玉置 淳子
口腔外科学教室 教授 植野 高章
中野 旬之
小越 菜保子
研究支援センター 医療統計室 室長 伊藤 ゆり

3) 『細菌叢解析方法の検討』

微生物学教室 教授 中野 隆史
坂口 翔一

座長：微生物学教室 教授 中野 隆史

4) 『胃癌に対する胃切除術および経口抗がん剤が

腸内細菌叢に及ぼす影響』

一般・消化器外科学教室 教授 内山 和久
今井 義朗
谷口 高平
李 相雄

5) 『人工肛門造設による非機能大腸が

口腔内・腸内細菌叢に及ぼす影響』

一般・消化器外科学教室 教授 内山 和久
特別任命教員教授 田中 慶太郎
大住 涉
谷口 高平
小越 菜保子
口腔外科学教室

6) 『PPI、免疫チェックポイント阻害剤などの薬剤による

腸内細菌叢への影響について』

内科学Ⅱ教室（消化器内科） 教授 樋口 和秀
平田 有基
朝井 章
柿本 一城
竹内 利秀

閉会のご挨拶：内科学Ⅱ教室 教授 樋口 和秀

【研究課題】

全身状態と口腔内細菌叢および腸内細菌叢の関連

植野 高章 (口腔外科学)

小越 菜保子 (口腔外科学)

大森 実知 (口腔外科学)

【背景】

近年の細菌叢研究の技術的進歩によって、ヒトと共存する常在細菌叢の機能がわかってきた。常在細菌数はヒトの細胞数より多く、全身の健康状態と関連する。腸内細菌叢の研究が先行しているが、口腔内細菌叢についても知見が増えてきている。口腔内細菌叢が、口腔内の疾患である、齲蝕、歯周病などのみでなく、悪性腫瘍、炎症性腸疾患などの全身疾患と関連することが明らかになりつつある。口腔内細菌叢の構成異常（ディスバイオーシス）が全身疾患の病態の発症や憎悪とどのように関連するのか、全身疾患によって口腔内細菌叢が変化するのかについて、詳細はわかっていない。口腔外科学教室では、疾患に特徴的な口腔内細菌叢を見出すこと、病態の変化に伴う口腔内細菌叢の変化を明らかにすることを目的に、これまでに学内外の多くの教室と共同研究を進めている。

【研究進捗概要】

1. 口腔内および腸内サンプル解析方法の確立

口腔サンプル採取方法： 口腔サンプルの採取のタイミングおよび採取方法のちがいが、細菌叢解析結果に及ぼす影響を評価した。その結果、食後2時間以上経過したタイミングでコットン法で採取する系を確立した。

16S メタゲノム解析： サンプルからの DNA 抽出および次世代シーケンサーによる配列解析は、大阪大学 微生物病研究所、(株)ピケンバイオミクスおよび(株)サイキンソーと共同研究契約を結び、解析依頼する系を確立した。さらにその後のバイオインフォマティクス解析に関しては微生物学教室と情報共有し、解析する体制を整えた。

2. 口腔細菌叢、腸内細菌叢の多様性に影響を与える因子の評価

高槻高齢者 201 名を対象に、性別や既往歴などの全身状態および口腔内の状態が口腔細菌叢および腸内細菌叢に及ぼす影響を評価した。その結果、特記すべき事項として、義歯の使用の有無によって、腸内細菌叢が大きく異なることが明らかになった。今後さらに解析を進める予定である。

3. 口腔細菌叢と疾患の関連

動脈硬化性疾患 (ACDV) 患者および2型糖尿病 (DM) 患者の口腔細菌叢の特徴について、それぞれ学会発表予定である。

【今後の展開】

これまでに、循環器内科、衛生学・公衆衛生学、微生物学、糖尿病内科、医療統計室、消化器外科、消化器内科、小児科、産科・婦人科、と共同研究を進めている。今後引き続き各教室と連携してサンプルを収集し、得られたサンプルの解析を進めていく予定である。

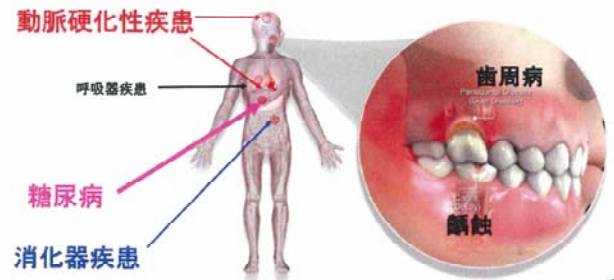
全身状態と口腔細菌叢および腸内細菌叢の関連

口腔外科学教室

20190904

口腔内細菌

口腔には700種以上の細菌が生息し、口腔局所のみでなく、全身の健康にも影響を及ぼす。



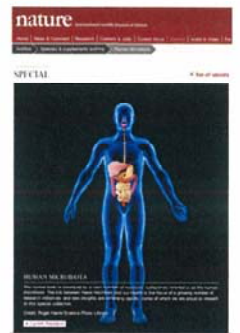
口腔内細菌が全身状態に影響する機序

- 直接他の組織に到達
 - ・血管に侵入 → 心内膜炎, 動脈硬化
 - ・誤嚥により気管へ → 肺炎
 - ・嚥下により消化管 → 腸内細菌叢
- 口腔内細菌の感染とそれに続く慢性炎症
 - 炎症性メディエーターが全身循環に流入
 - 代謝異常, メタボリックシンドローム



常在細菌叢

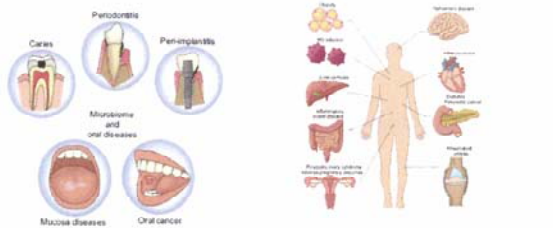
- ヒトの細胞の数より、常在細菌の数の方が多い。
 - 一人のヒトの細胞の数：約37兆個
 - 一人のヒトの常在細菌の数：数10~100兆個
- 常在細菌叢が、全身の健康状態と深く関連していることがわかってきた。



Nature, 12 May 2011

口腔内細菌叢

口腔内細菌叢が口腔局所のみでなく、全身の健康にも影響を及ぼす可能性がある。



齲蝕, 歯周病, 口腔粘膜病など

肥満, 糖尿病, 動脈硬化, 悪性腫瘍, 関節リウマチ, 炎症性腸疾患など

口腔内細菌叢と各種疾患の関連

- 口腔内細菌叢の構成異常 (Dysbiosis) が、全身疾患の発症や憎悪と関連？



- 全身疾患の罹患によって、口腔内細菌叢は変化？

目的

- 疾患に特徴的な口腔内細菌叢を見出すこと
- 病態の変化に伴う口腔内細菌叢の変化を明らかにすること

8

進捗状況

1. 口腔サンプル採取方法の検討
2. 口腔細菌叢の多様性に影響を与える因子
3. 腸内細菌叢の多様性に影響を与える因子
4. 口腔細菌叢と疾患との関連

9

1. 口腔サンプルの採取方法の検討

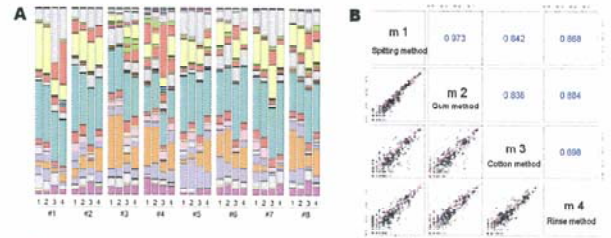
- m1 : Spitting method (吐唾法)
- m2 : Chewing gum method (ガム法)
- m3 : Cotton method (コットン法)
- m4 : Oral rinse method (含漱法)



各方法による細菌叢の違いを比較検討

- 吉川ら, 唾液からのサンプリングによるオーラルフローラの探索的研究
日本口腔ケア学会雑誌, 2019 13(2) p47-50

10



4つの方法間で属レベルの細菌構成に高い相関がみられた。

→ コットン法 (m3) を採用

- Omori et al.

Comparative evaluation of oral microbiome in different sample collection timing and method, *Clinical Oral Investigations* 投稿中

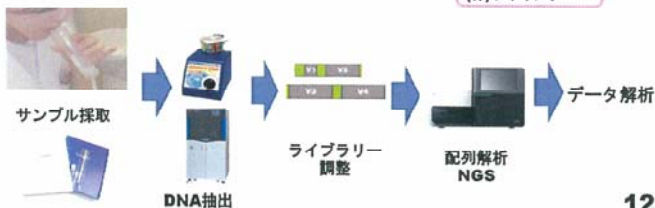
11

口腔および腸内細菌叢の16Sメタゲノム解析

1. 唾液および便サンプル採取
2. DNA抽出: ビース法, フェノールクロロホルム抽出
3. ライブラリー調整: 16SrRNA 遺伝子のV1-V2領域を PCR増幅
4. 配列解析: 次世代シーケンサーMISEq (イルミナ社)
5. データ解析

大阪大学 微生物学研究所 (株) ビケンバイオミクス

微生物学教室 (株)サイキンソー



12

腸内サンプルの採取方法

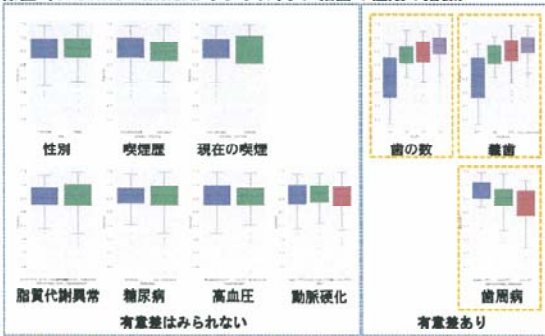


13

2. 口腔細菌叢と全身および口腔状態

解析対象者：高槻高齢者201名

α多様性 (Shannon index: サンプル内の細菌の種類指標)



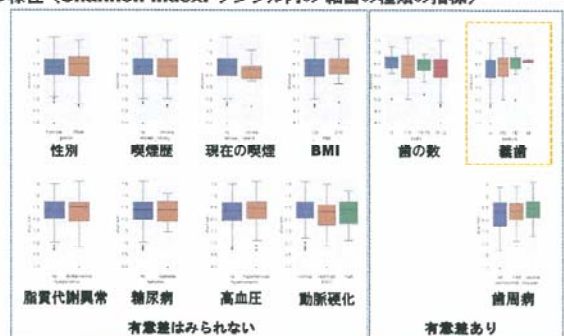
歯の数が ないが、総歯数では、α多様性低く、歯周病が重度の場合、α多様性高い

14

3. 腸内細菌叢と全身および口腔状態

解析対象者：高槻高齢者208名

α多様性 (Shannon index: サンプル内の細菌の種類指標)



● 義歯使用で、口腔内のみでなく腸内の細菌叢の多様性に違いがある

14

4. 口腔細菌叢と疾患との関連

1) 動脈硬化性疾患 (ACVD) 患者の口腔細菌叢

循環器内科
衛生学・公衆衛生学
微生物学
医療統計室

● *American Heart Association (AHA) Scientific Sessions 2019 (Nov. 16-18, 2019) にて発表予定*
Hoshiga. M. et al., Characterization of salivary microbiota in patients with atherosclerosis and its potential as a biomarker.

2) 2型糖尿病 (DM) 患者の口腔細菌叢

糖尿病代謝内分泌内科
衛生学・公衆衛生学
微生物学

● *International Diabetes Federation (IDF) Congress 2019 (Dec. 2-6, 2019) にて発表予定*
Omori. M. et al., Characterization of salivary microbiota in elderly Japanese patients with type 2 diabetes

15



16

【研究課題】	
循環器内科疾患患者の口腔内細菌叢の評価	
星賀 正明 (循環器内科)	玉置 淳子 (衛生学・公衆衛生学)
植野 高章 (口腔外科学)	中野 旬之 (口腔外科学)
小越 菜保子 (口腔外科学)	伊藤 ゆり (医療統計室)
【目的】	
<p>歯周病と動脈硬化性の血管障害の関連については、1980年代から多くの疫学研究によって示されてきている。2012年のアメリカ心臓病学会（AHA）の声明では歯周病と動脈硬化性心血管障害には「関連」はあるが、「原因」であることはいえないとされ、現在も不明な点が多い。歯周病細菌や齶蝕原細菌が動脈硬化の病変部から検出されること、動物モデルでこれらの細菌が血管病変を形成することが報告されている。これらの特定の細菌ではなく、口の中の細菌叢全体を評価することが、本研究の目的である。腸内細菌叢と動脈硬化性の疾患の関連については研究が先行している。口腔内細菌叢が腸内細菌叢に影響を及ぼし、動脈硬化に関連する可能性が動物実験で示されている。本研究の目的は、動脈硬化性血管疾患（ACVD）患者に特徴的な口腔内細菌叢を明らかにすることである。</p>	
【方法】	
<p>対象者は、ACVD患者群39人および年齢、性別をマッチングさせたACVDの既往のないコントロール（non-ACVD）群76人とした。患者は循環器内科で診断、歯科口腔外科に紹介された患者から、コントロールは衛生学・公衆衛生学と口腔外科学で行っている高槻市民健康調査対象者から選択した。対象者から全身状態、口腔状態の情報を得るとともに、唾液をコットン法で採取し、唾液サンプルの16Sメタゲノム解析を行った。</p> <p>ACVD患者群とコントロール群の口腔内細菌叢を比較するために、多様性の解析およびLEfSe解析を行った。さらにACVD患者に特徴的なマーカーとしての細菌群を見出すために、統計学的機械学習の手法（ランダムフォレスト解析）を用いて検証した。</p>	
【結果】	
<p>ACVD群とnon-ACVD群の口腔細菌叢の構成に違いがみられた。多様性解析によって、α多様性は有意な違いはみられなかったが、β多様性は有意に異なっていた。さらにLEfSe解析によって、ACVD患者ではアクチノバクテリア門が多く、バクテロイデテス門が少ない傾向がみられた。さらにランダムフォレスト解析の結果、ACVD患者の判別に寄与する重要度の高い菌を25種抽出した。テストデータに対する適合度はROC=0.79であり、中程度の予測性能が得られた。</p>	
【今後の展開】	
<p>動脈硬化性疾患患者に特徴的な口腔細菌叢を見出すことができたことから、この成果をAmerican Heart Association (AHA) Scientific Sessions 2019 (Nov. 16-18, 2019)にて発表予定である（Hoshiga. M. et al., Characterization of salivary microbiota in patients with atherosclerosis and its potential as a biomarker.）。本研究は、循環器内科、衛生学・公衆衛生学、微生物学、医療統計学、口腔外科学の共同研究の成果であり、今後も教室の枠組みに捕らわれず、多方面からの研究を展開していく予定である。</p>	

循環器内科疾患患者の口腔内細菌叢の評価

循環器内科学
口腔外科学
衛生学・公衆衛生学
微生物学
医療統計室

20190904

1

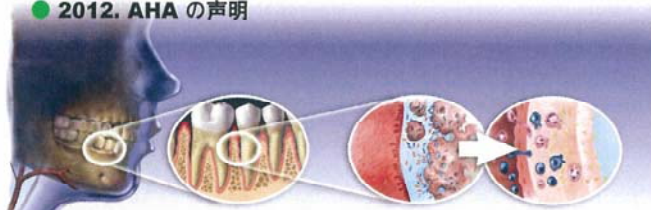
背景

- 歯周病と動脈硬化性血管障害の関連
- 口腔細菌と血管病変
- 腸内細菌叢と動脈硬化性血管障害の関連

2

歯周病と動脈硬化性血管障害の関連

- 歯周病と血管疾患に関する疫学的研究
- 2012. AHA の声明



歯周病は動脈硬化症のリスク因子
歯周病原細菌による慢性感染が全身に軽微な炎症を持続させ、動脈硬化症を悪化させると考えられている

3

口腔細菌と血管病変の関連

- 歯周病細菌 *P. gingivalis*,
齧蝕原細菌 *S. mutans*
動脈硬化の病変部から検出



- 動物モデルで血管病変形成

4

腸内細菌叢と動脈硬化性血管障害の関連

- 腸内細菌と動脈硬化性血管障害の関連については研究が先行
Nat Commun. 2017. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease.
- 口腔内細菌叢が、腸内細菌叢に影響を及ぼし、
動脈硬化性血管障害に関連する可能性も示唆されている。

5

目的

動脈硬化性血管疾患 **atherosclerotic cardiovascular disease (ACVD)** 患者に特徴的な口腔内細菌叢を明らかにすること

- ➡ 口腔環境がACVDの予測に役立つ可能性を評価

6

対象および方法

- **ACVD患者群**
循環器内科にて診断, 歯科口腔外科に紹介, 患者から唾液サンプル採取, 口腔状態精査
- **non-ACVD群**
衛生学・公衆衛生学と行っている高槻市民健康調査において, 唾液サンプル採取, 全身および口腔状態精査
ACVDの既往のない人を対象に, 患者群と性別および年齢をマッチングさせて選択

除外基準:
肝疾患, 腎疾患, 膠原病 の既往がある症例, 悪性腫瘍の現病歴がある症例, 抗菌薬服用中の症例

7

対象者の特性

Variables	ACVD (n=39)	Non-ACVD (n=76)	P value
Characteristics			
age *1	74.4±5.0	75.2±4.9	p=0.377
Sex (male, %)	25.6	26.3	p=1.000
BMI	23.5±2.8	22.8±2.8	p=0.207
History of smoking (%)	74.4	48.7	p=0.010
Current smoking (%)	7.7	1.3	p=0.112
Dyslipidemia (%)	43.6	28.9	p=0.146
Hypertension (%)	48.7	43.4	p=0.693
Diabetes (%)	38.5	9.7	p=0.043
Oral condition			
Number of tooth *1	18.0±8.1	21.4±8.2	p=0.083
Denture wearing (%) *2	61.5	46.1	p=0.121
Severe periodontitis (%) *2	23.1	28.9	p=0.072
PISA (cm ²) *1	226.8±471.5	151.0±198.7	p=0.005

8

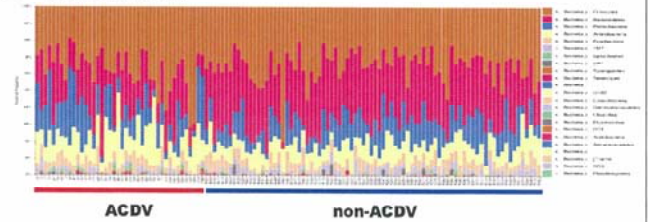
対象者の特性

Variables	ACVD (n=39)	Non-ACVD (n=76)	P value
Medications			
Anti-diabetes drug (%)	25.6	7.9	p=0.020
Statin (%)	69.2	23.7	p<0.001
ACE-I/ARB (%)	56.4	19.7	p<0.001
beta-Blocker (%)	25.6	3.9	p=0.001
Calcium channel blocker (%)	59.0	23.7	p<0.001
PPI/H2 blocker (%)	41.0	18.4	p=0.013
Anti-coagulant (%)	12.8	6.6	p=0.303
Anti-platelet (%)	59.0	7.9	p<0.001
Laboratory data			
Creatinine (mg/dL) *1	1.15±1.10	0.82±0.19	p=0.005
HDL-C (mg/dL) *1	54.1±16.1	64.8±19.6	p=0.002
LDL-C (mg/dL)	110.5±39.4	116.6±29.1	p=0.418
TG (mg/dL) *1	137.6±66.9	85.3±41.3	p<0.001
HbA1c (NGSP %) *1	6.1±0.8	5.9±0.6	p=0.360
CRP (mg/dL) *1	0.49±1.37	0.03±0.06	p<0.001

9

口腔細菌叢の16s メタゲノム解析

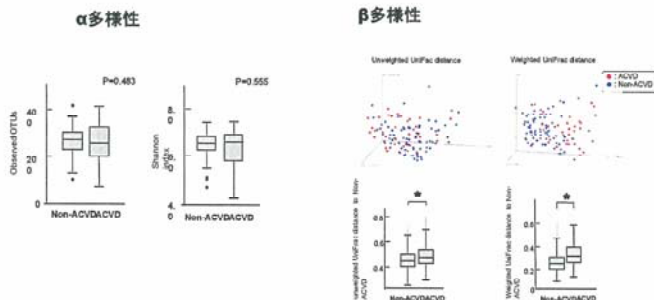
門レベル細菌構成比率



細菌叢の比較解析: 微生物学と共同研究

10

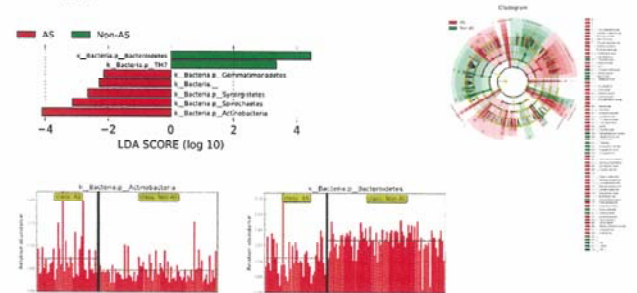
多様性の解析



11

菌叢比較解析

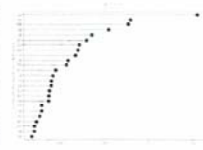
レフセ解析



12

菌叢比較解析

ランダムフォレスト解析



OTU	OTU	OTU	OTU	OTU	OTU	OTU	OTU	OTU	OTU
OTU1	OTU2	OTU3	OTU4	OTU5	OTU6	OTU7	OTU8	OTU9	OTU10
OTU11	OTU12	OTU13	OTU14	OTU15	OTU16	OTU17	OTU18	OTU19	OTU20
OTU21	OTU22	OTU23	OTU24	OTU25	OTU26	OTU27	OTU28	OTU29	OTU30
OTU31	OTU32	OTU33	OTU34	OTU35	OTU36	OTU37	OTU38	OTU39	OTU40
OTU41	OTU42	OTU43	OTU44	OTU45	OTU46	OTU47	OTU48	OTU49	OTU50
OTU51	OTU52	OTU53	OTU54	OTU55	OTU56	OTU57	OTU58	OTU59	OTU60
OTU61	OTU62	OTU63	OTU64	OTU65	OTU66	OTU67	OTU68	OTU69	OTU70
OTU71	OTU72	OTU73	OTU74	OTU75	OTU76	OTU77	OTU78	OTU79	OTU80
OTU81	OTU82	OTU83	OTU84	OTU85	OTU86	OTU87	OTU88	OTU89	OTU90
OTU91	OTU92	OTU93	OTU94	OTU95	OTU96	OTU97	OTU98	OTU99	OTU100

ACVDに特徴的な細菌属レベル

13

まとめ

ACVD患者はnon-ACVDと有意に異なる口腔細菌叢を示し、ACVD患者に特徴的な細菌群を見いだすことができた。

- *American Heart Association Scientific Sessions 2019* (Nov. 16-18, 2019) にて発表予定
Hoshiga. M. et al., Characterization of salivary microbiota in patients with atherosclerosis and its potential as a biomarker.

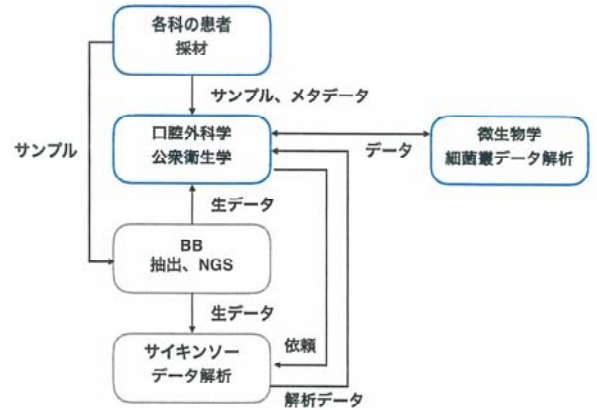
14

【研究課題】	
細菌叢解析方法の検討	
中野隆史（微生物学）	坂口翔一（微生物学）
【目的】	
<p>微生物学教室では、次世代シーケンスを用いた未知のウイルス探索やウイルス叢（Virome）解析を行っている。こうしたリソースを利用し、大阪医科大学私学ブランディング事業・口腔内細菌と疾患研究では、データ解析を担当することとなった。今回我々は、疾患の形成に関わる口腔内細菌叢を明らかにするため、細菌叢解析パイプライン Qiime2 を中心とする解析系を立ち上げた。</p>	
【方法】	
<p>大阪医科大学循環器内科の入院患者および高槻シニアコホート研究の参加者から、唾液をコットン法により採取し、DNA を抽出した。これら DNA の 16S rRNA 遺伝子を PCR 法により増幅し、MiSeq で 16S メタゲノム解析を行った。得られた配列データを Qiime2 に読み込み、門および属レベルにおける細菌の構成や、α・β 多様性の比較を行った。得られた細菌構成データを元に LEfSe 解析およびランダムフォレスト解析を行い、循環器疾患患者の口腔内で増減する細菌を調べた。</p>	
【結果】	
<p>循環器疾患患者の口腔内では、5 つの細菌門が有意に増加し、特にアクチノバクテリア門が増加していた。また、40 属の細菌が増加し、これらの中にはすでに動脈硬化との関連が報告されているストレプトコッカス属やクロストリジウム属も含まれていた。ランダムフォレスト解析では 25 属の細菌が特徴的な細菌として検出され、中程度の判別能をもつ分類器が得られた。循環器疾患患者群と対照群の多様性を比較したところ、α 多様性には有意差はみられず、β 多様性には有意差がみられた。</p>	
【考察】	
<p>アテローム性動脈硬化病変の形成に腸内細菌叢が関与することや、血管内病巣から口腔内細菌が検出されることが知られている。しかし、循環器疾患の病態形成と口腔内細菌叢の関係は不明瞭である。今回我々は、循環器疾患患者群と対照群の口腔内細菌叢が異なることを示し、さらに口腔内細菌叢の構成により疾患・非疾患を分類するシステムを構築した。病態発生機序の解明や臨床応用のためには、より多面的な解析を行う必要がある。</p>	
【結論】	
<p>各診療科の患者の唾液から、口腔外科学が中心となって DNA 抽出およびシーケンス解析を行い、公衆衛生学が疾患群と対照群のマッチングを行うことでデータセットを作成し、配列データを微生物学が中心となって解析するという研究体制ができた。また対照群として高槻シニアコホート研究の参加者の検体・データを集めた。今後さらに研究を充実させ、16S メタゲノム解析に加えて様々なオミックス研究や Virome 研究を行うことで「たかつきモデル」の発展に寄与したい。</p>	
【文献】	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Bolyen, E. <i>et al.</i> (2019). Nature Biotechnology. 2. Proctor, L. M., <i>et al.</i> (2019). Nature 	

細菌叢解析方法の検討

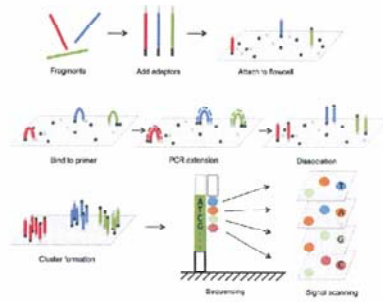
微生物学教室 坂口翔一、中野隆史

2 サンプル・データの流れ



3 次世代シーケンス解析で得られる生データ

- ・ illumina系次世代シーケンス
- ・ 16Sメタゲノム解析
- ・ FASTQデータ



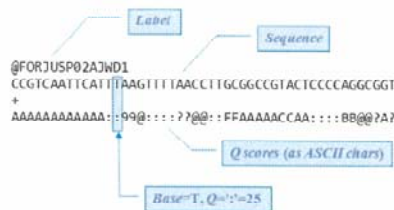
4 次世代シーケンス解析で得られる生データ

- ・ illumina系次世代シーケンス
- ・ 16Sメタゲノム解析
- ・ FASTQデータ



5 次世代シーケンス解析で得られる生データ

- ・ illumina系次世代シーケンス
- ・ 16Sメタゲノム解析
- ・ FASTQデータ



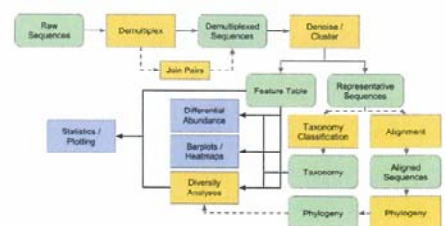
6 生データから細菌叢データへ



Communications | Published 24 July 2019

Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2

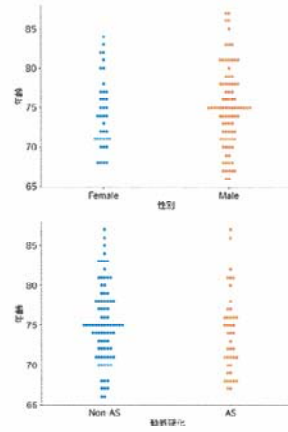
Evan Bolyen, Jai Ram Rideout, [...] & Gregory Caporaso



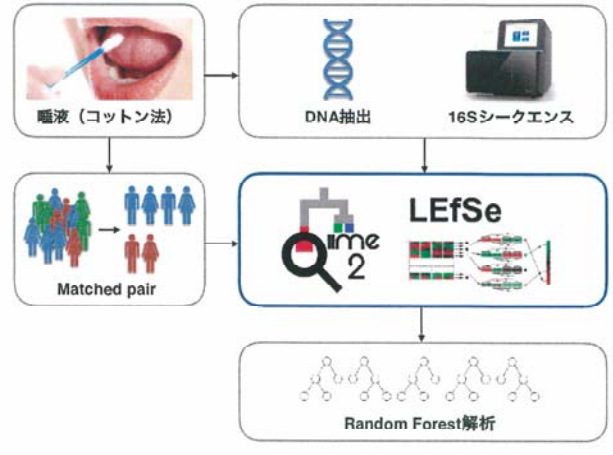
7 循環器内科疾患患者の口腔内細菌叢の評価

患者データ115名分 (matched pair)

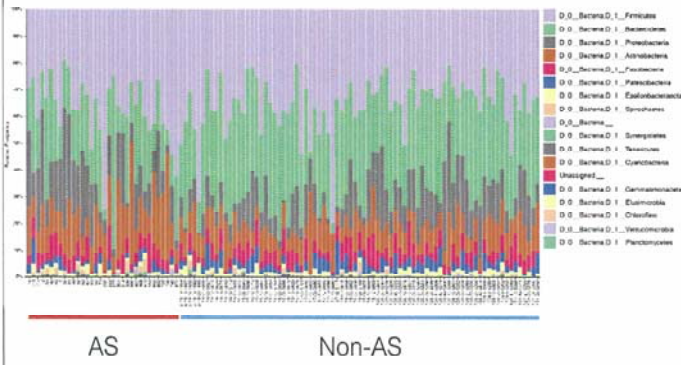
- 対称群 (Non-AS) 76名
- 患者群 (AS) 39名
 - 冠動脈疾患
 - 下肢閉塞性動脈硬化症
 - 腹部大動脈瘤



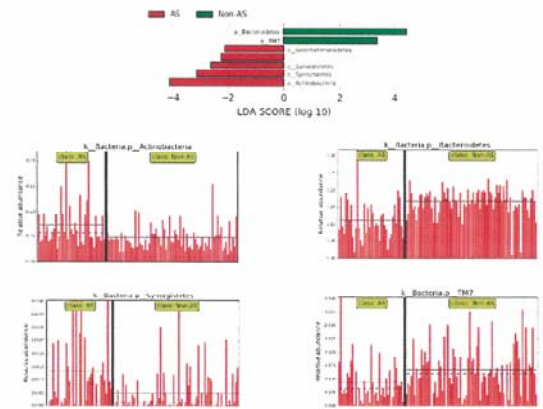
8 材料と方法



9 細菌叢の構成 (門レベル)



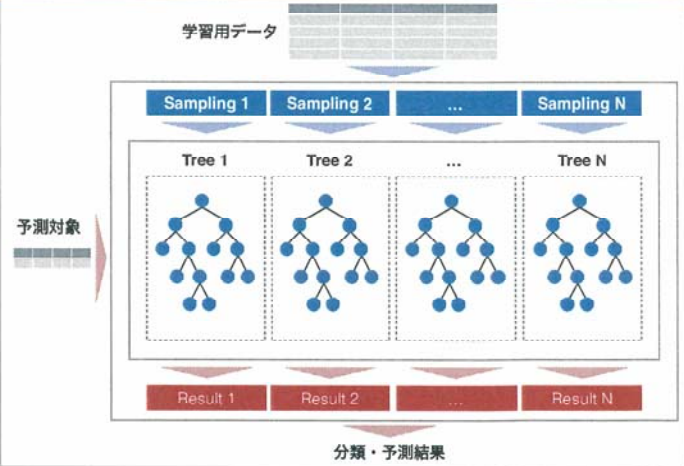
10 LEfSe解析 (門レベル)



11 LEfSe解析 (属レベル)

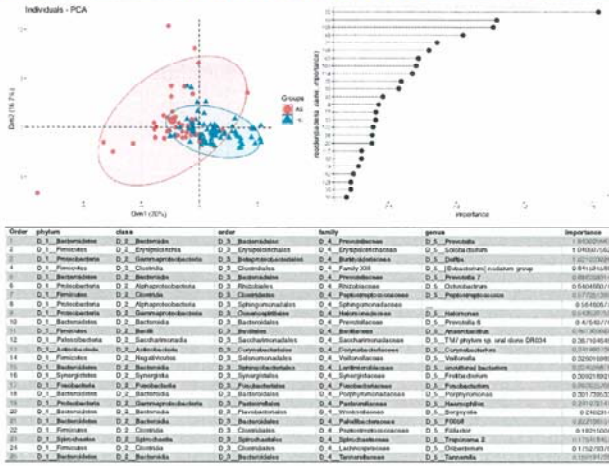


12 Random Forest解析



13

Random Forest解析



14

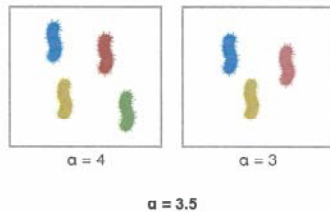
多様性

- ・ α多様性：患者内の多様性
 - ・ β多様性：患者間の多様性
 - ・ γ多様性：全体の多様性
- $$\gamma = \alpha \times \beta$$

15

多様性

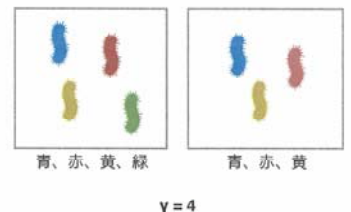
- ・ α多様性：患者内の多様性
 - ・ β多様性：患者間の多様性
 - ・ γ多様性：全体の多様性
- $$\gamma = \alpha \times \beta$$



16

多様性

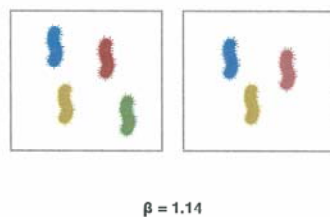
- ・ α多様性：患者内の多様性
 - ・ β多様性：患者間の多様性
 - ・ γ多様性：全体の多様性
- $$\gamma = \alpha \times \beta$$



17

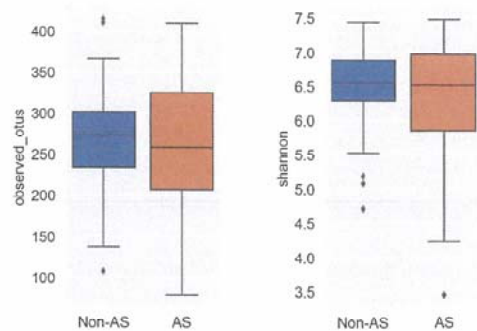
多様性

- ・ α多様性：患者内の多様性
 - ・ β多様性：患者間の多様性
 - ・ γ多様性：全体の多様性
- $$\gamma = \alpha \times \beta$$



18

α多様性



【研究課題】	
胃癌に対する胃切除術および経口抗がん剤が腸内細菌叢に及ぼす影響	
今井 義朗 (一般・消化器外科)	谷口 高平 (一般・消化器外科)
李 相雄 (一般・消化器外科)	田中 亮 (一般・消化器外科)
本田 浩太郎 (一般・消化器外科)	内山 和久 (一般・消化器外科)
【目的】	
<p>常在細菌の約 8 割は培養できない細菌であるため、従来の培養法では常在細菌叢の全貌を明らかにすることは困難であった。近年、細菌の 16S リボソーム RNA 遺伝子を対象としたゲノム解析法が常在細菌叢研究に適用され、多くの新知見が報告されてきた。</p> <p>そこで今回胃切除術を行う胃癌患者の術前術後で、口腔内細菌叢、胃内細菌叢や腸内細菌叢の変化を確認して、食事摂取量、体重変化と再建術式との関連を調べる。</p> <p>また術後補助化学療法の完遂率と細菌叢との関連も調べる。</p>	
【方法】	
<p>2019 年 1 月から当科で胃癌患者に対して胃切除術を施行する患者を対象に、術前口腔内細菌叢、胃内細菌叢、腸内細菌叢を測定する。術後半年後に、再度口腔内細菌叢、胃内細菌叢、腸内細菌叢を測定して、体重変化や食事摂取量の比較検討を行う。</p> <p>また術後補助化学療法施行する患者に対しては、化学療法開始前に口腔内細菌叢、腸内細菌叢を測定し、化学療法開始 2 ヶ月後に再度口腔内細菌叢、腸内細菌叢を測定して、化学療法の副作用や完遂率との比較検討を行う。</p> <p>胃内細菌叢に関しては、上部内視鏡検査で胃液採取して測定する。</p>	
【結果】	
<p>2019 年 1 月より、現在までに 48 検体を回収できた。今後、術後半年後の検体を採取して比較検討を行う予定である。現時点では、術前検体が主であり比較検討はできていない。</p> <p>本研究を開始するにあたって、胃細菌叢の採取方法が問題となった。</p>	
【考察】	
<p>胃細菌叢の測定に関しては、胃液を上部内視鏡にて回収して測定する方針とした。その際の contamination が危惧された。測定結果は、口腔内細菌の他に、Helicobacter 属、Xanthomonas 属なども検出されていた。Xanthomonas 属は植物に見られる属であるが、キサントタンガムの製造にも使用される。薬剤の増粘剤などに使用されたキサントタンガムに混入していた DNA が増幅された可能性があと考えた。胃細菌叢は十分検出できており、contamination の影響は少ないと考えて、本研究は続行している。</p>	
【結論】	
<p>胃細菌叢の測定は、内視鏡での胃液採取からの測定で可能である。今後、術後半年後の検体を集積して、比較検討を行う</p>	



胃癌に対する胃切除術および経口抗がん剤が腸内細菌叢に及ぼす影響

大阪医科大学 一般・消化器外科
今井 義朗、谷口 高平、李 相謙、田中 亮
本田 浩太郎、内山 和久

口腔外科学教室
小越菜保子、大森実知、植野 高章

細菌叢研究会グループ報告会 2019年9月4日

背景

- ✓生体内に棲みつく常在細菌の約 8 割は培養できない細菌であるため、従来の培養法では常在細菌叢の全貌を明らかにすることは困難であった。
- ✓近年、細菌の 16S リボソーム RNA 遺伝子を対象としたゲノム解析法が常在細菌叢研究に適用され、多くの新知見が報告されてきた。



胃内細菌叢

- ✓H. pyloriは胃に定着する細菌であることは知られているが、近年、ゲノム解析法が確立され、H. pylori以外の細菌も、胃に生息していることが徐々に明らかにされてきた。
- ✓胃内細菌叢の全貌は明らかにされていなく、その作用もまだ不明である。



- ✓胃内常在細菌叢とピロリ菌の関連

Schulz C. *BMJ*. 2016

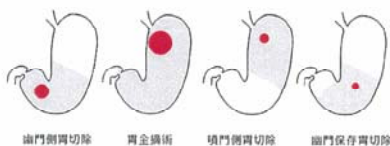
Aviles-Jimenez F. *Sci Rep*. 2014

- ✓機能性ディスペプシア病因としての胃内細菌叢との関連

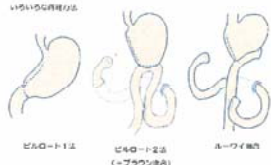
Igarashi M. *BMJ Open Gastroenterol*. 2017



胃切除術



いろいろな胃切除法



胃切除後障害

- ✓胃切除後障害は**機能的障害**と**器質的障害**に分けられる。
- ✓胃癌などの原疾患の治療目的で行われる胃切除および迷走神経切除により、これらは担う生理的な役割が減弱または欠如するために起こる医原性の病態です。



胃切除後障害 機能的障害

- ✓ダンピング症候群(早期、後期)
- ✓小胃症状
- ✓Roux-en-Y症候群
- ✓胃アトニー(gastric atony)
- ✓乳糖不耐症
- ✓消化吸収障害
- ✓その他の消化器症状(胸焼け、逆流、膨満感、下痢、便秘…)



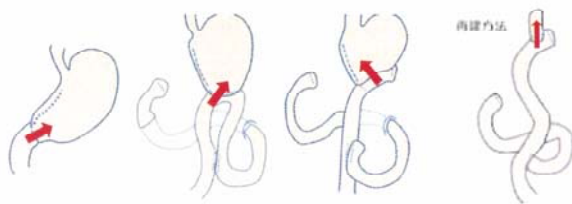
胃切除後患者の日常診療の問題点

- ✓機能的障害を訴える患者が多いが、検査しても異常が認められない事が多い。
- ✓Stage II, III患者は、術後補助化学療法として、S-1の1年間の内服が推奨されているが、食欲低下、倦怠感等で完遂できない症例が多い。



口腔内細菌叢、胃内細菌叢が関連しているのでは？

仮説



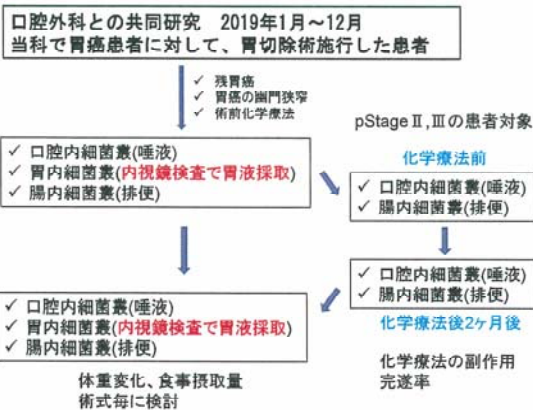
逆流による口腔内細菌叢、胃内細菌叢の変化

目的

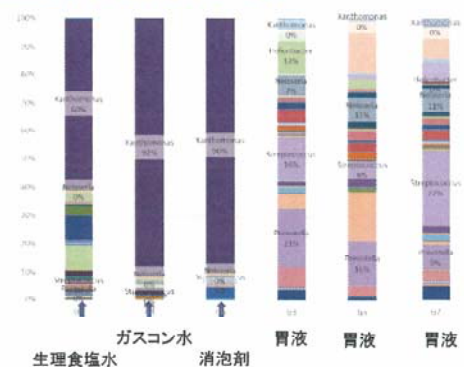
- ✓Primary endpoint:
胃切除術を行う胃癌患者の術前術後で、
口腔内細菌叢、胃内細菌叢や腸内細菌叢の変化を確認する
- ✓Secondary endpoint:
食事摂取、体重変化と細菌叢(口腔内、胃内、腸内)の関連
再建術式と細菌叢(口腔内、胃内、腸内)の関連
術後補助化学療法の完遂率と細菌叢(口腔内、胃内、腸内)の関連



方法



Preliminary 内視鏡サンプル

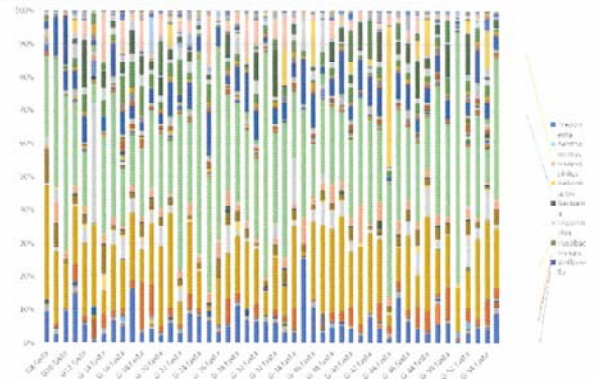


Preliminary 結果

- 口腔内細菌の他に、Helicobacter属、Xanthomonas属などが検出されている。
- Xanthomonas属は植物に見られる属であるが、キサントランガムの製造にも使用される。薬剤の増粘剤などに使用されたキサントランガムに混入していたDNAが増幅された可能性がある。
- 胃細菌叢は検出できていると考える。コンタミの影響は少ない。



途中経過 N=48



通常のバックグラウンドに散見される菌は大きな成分としては含まれないので、菌量は十分採取できていると考えられる。

【研究課題名】	
人工肛門造設による非機能大腸が口腔内・腸内細菌叢に及ぼす影響	
大住渉(一般消化器外科)	田中慶太郎(一般消化器外科)
谷口公平(一般消化器外科)	小越菜保子(口腔外科学)
大森美知(口腔外科学)	坂口翔一(微生物学)
【目的】	
大腸癌手術患者の口腔内細菌叢、腸内細菌叢を解析し、大腸癌患者の手術期、周術期の消化細菌叢変化を消化管全体象として捉える。結果を大腸癌の予防、大腸癌周術期に生じる合併症対策、大腸癌治療効果判定因子、合併症予測因子として応用する。	
【方法】	
<p>腸内フローラ検査はキット化 (Mykinso Pro:サイキンソー社) されているため、自宅でも容易に糞便の採取が可能で、郵送により検体を確実に収集することができる。解析は、大阪大学微生物病研究所内にある株式会社ビケンバイオミクスと契約を締結している。</p> <p>手術前の外来初診時に検査キットを手渡し、自宅で採便し検体を郵送する。また手術前には口腔内ケアを目的に口腔外科受診を必ず行うため、口腔外科受診時に唾液を採取する。人工肛門を閉鎖する際には同様の処置を行う。術前後の進行度に従い、術前 (NAC)、術後 (adj) 化学療法が追加されるが、全ての治療が終了し状態の落ち着いた6カ月を目安に最終の便・唾液採取を行う。腹腔鏡手術単独群、人工肛門の有無、化学療法の有無にて、4群に分けてサンプル集積を行う。</p>	
【結果】	
<p>各サンプルの終了にはおよそ1年かかり、現在計89名でサンプル採取を開始しているが、プロトコールの全工程が終了した症例は、現在はない。今回は大腸癌周術期に生じる合併症対策の検討として、小腸人工肛門術後に生じる非特異性腸炎について検討を行った。</p> <p>本研究症例で人工肛門閉鎖術を施行した39例の内、3例に非特異性腸炎の症例を認めた。経過の問題なかった症例を control、非特異性腸炎を起こした症例を腸炎群として、腸内フローラの検討をおこなった。Observed OTUs・shannon index の解析結果では、腸炎群で多様性の低下傾向を認めた。Unweighted UniFrac Distance の解析結果では、腸炎群に明らかな Dysbiosis の形成は認めなかった。LEfSe 解析では、菌量の多寡を認めた菌種は12種であった。</p>	
【考察】	
<p>回腸人工肛門閉鎖術後におこる非特異性腸炎は稀ではあるが、時として control 不良のため大腸垂全摘を追加した症例も当科では認めた。高度の炎症、腸管拡張、著明な大腸粘膜の炎症が主体で、臨床的に明らかな誘因・特異的な細菌も認めず原因不明の周術期におこる問題の一つであった。</p> <p>腸内フローラの検討では、有意差は認めなかったが、多様性の低下傾向はあった。また菌量の多寡を認めた菌種も12種類認めた。この結果についても詳細な検討を追加するが、今後は様々病態についての検証も追加していく予定である。</p>	
【結論】	
<p>研究中の “人工肛門造設による非機能大腸が口腔内・腸内細菌叢に及ぼす影響 ” の概要について報告した。サンプルの集積も良好で、徐々に解析を開始しできる見込みである。</p>	



人工肛門造設による非機能大腸が 口腔内・腸内細菌叢に及ぼす影響

大阪医科大学 一般・消化器外科教室
大住渉、田中慶太郎、谷口高平、内山和久
口腔外科学教室
小越菜保子、福居希、大森爽知
微生物学教室
坂口翔一



背景(人工肛門造設状態の体の変化)

Stoma(人工肛門)とは、腸管の一部を体外へ誘導し、肛門に代わって便の排出を行う開放孔

腸管切除を伴う手術時の吻合部安静
大腸腫瘍による大腸閉塞の減圧・予防 目的に作成する

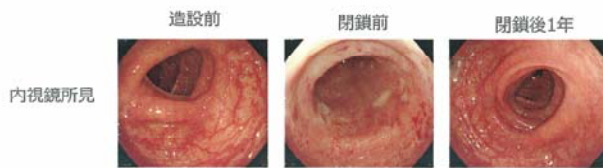
吻合部・全身状態に大きな問題なければ、おおよそ6カ月後に閉鎖することが多い。



人工肛門造設状態では、肛門側の腸管へは腸管内容物が通過せず、
一時的に非生理的環境となる



背景(人工肛門造設状態の体の変化)



内視鏡所見

人工肛門造設に伴い、一時的に腸内細菌叢の恒常性が喪失する可能性が高い



背景(人工肛門造設状態の体の変化)

- ①人工肛門を造設すると、腸内細菌叢はどのように変化するのか？
- ②人工肛門造設に伴う腸内細菌叢の変化は、全身にどのような影響があるのか？
一時的な腸内細菌叢の構成変化が、術後合併症の対策、免疫力の変化、大腸癌術後の長期成績までの影響するのではないかと？
- ③人工肛門造設に伴う腸内細菌叢の変化は、他の消化管細菌叢へのどのように影響するのか？
口腔外科との共同研究により、大腸癌手術周術期の口腔内細菌叢の構成変化も検証



方法

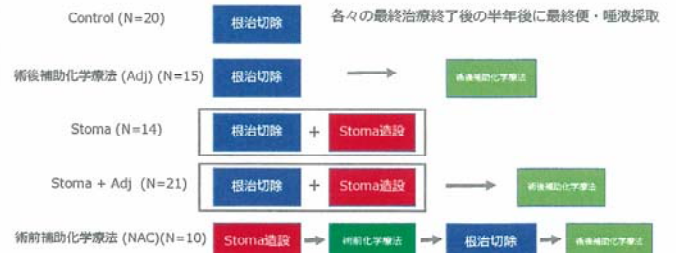
期間： 2018年6月 ~ 2019年8月現在
対象：一時的人工肛門造設を伴う可能性のある直腸癌術前患者
(手術加療を行う前に30%以上の確率で人工肛門が必要と判断)



根治術施行時に、人工肛門が造設されなかった症例をcontrol群とした。



患者背景 (N=80)



目的

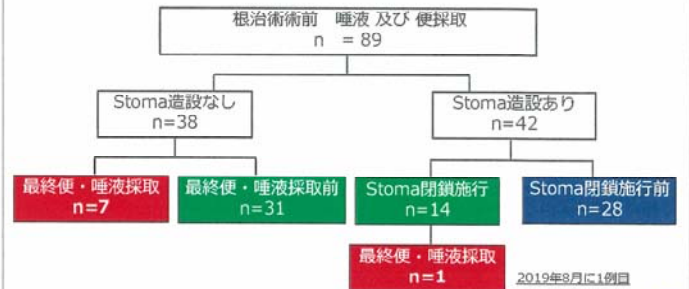
Primary endpoint:
生理機能の休止による腸内(口腔内)細菌叢の変化を確認する

Secondary endpoint :
大腸炎の発症と腸内細菌叢(口腔内)の関連
生理機能の休止期間と腸内細菌叢(口腔内)の関連
術前加療の有無と腸内細菌叢(口腔内)の変化
術後排便機能が安定した時点での腸内細菌叢(口腔内)の変化

直腸癌患者の人工肛門形成及び治療に伴う腸内細菌叢及び口腔内細菌叢の変化の把握を行い、消化管全体の細菌叢変化を把握し、手術成績・術後QOLの改善につなげる。



進捗状況 (2019年8月)



目的

Primary endpoint:
生理機能の休止による腸内(口腔内)細菌叢の変化を確認する

Secondary endpoint :
大腸炎の発症と腸内細菌叢(口腔内)の関連
生理機能の休止期間と腸内細菌叢(口腔内)の関連
術前加療の有無と腸内細菌叢(口腔内)の変化
術後排便機能が安定した時点での腸内細菌叢(口腔内)の変化

直腸癌患者におけるStoma形成及び治療に伴う腸内細菌叢及び口腔内細菌叢の変化の把握を行い、消化管全体の細菌叢変化を把握し、手術成績・術後QOLの改善につなげる。



ileostomy閉鎖時の非特異性腸炎群における腸内細菌の検討

Ileostomy(小腸人工肛門)閉鎖時に、高熱・高度の炎症所見上昇を呈する非特異性腸炎を認める事がある。

当科での非特異性腸炎の定義は

- ①39℃以上の発熱・もしくは高度の炎症所見(WBC・CRP)
- ②CTなどにて糞合不全の所見を認めない
- ③尿路・呼吸器などの他疾患が除外できる とした

当科で昨年度手術を施行した39例の内、3例に非特異性腸炎の症例を認めた。



ileostomy閉鎖時の非特異性腸炎群における腸内細菌の検討

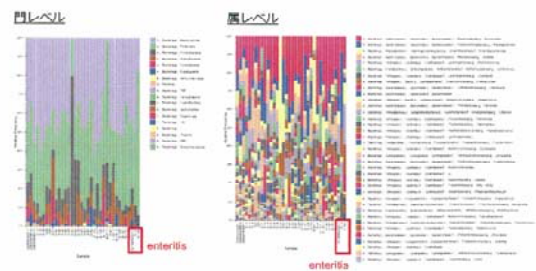
仮説) ileostomy造設により生じた腸内フローラの乱れが、ある特異的な細菌叢を異常発生させ病態を引き起こした。

方法) Ileostomy閉鎖後の第一便は閉鎖術前の腸内フローラを反映していると考えた上で、閉鎖術後の第一便で腸内細菌の検討を行った。



ileostomy閉鎖時の非特異性腸炎群における腸内細菌の検討

taxa-bar-plots



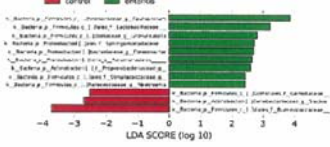
ileostomy閉鎖時の非特異性腸炎群における腸内細菌の検討

LEfSe

門レベル

有意差なし

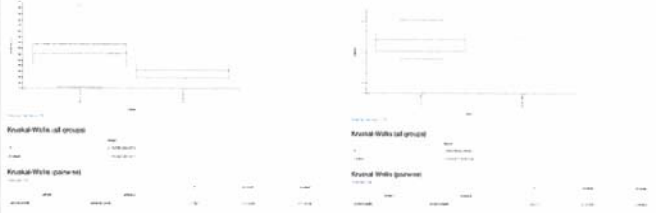
属レベル



ileostomy閉鎖時の非特異性腸炎群における腸内細菌の検討

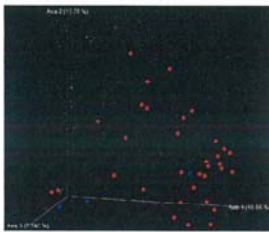
Observed OTUs

Shannon index

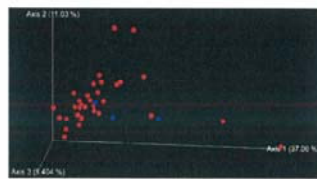


ileostomy閉鎖時の非特異性腸炎群における腸内細菌の検討

Unweighted UniFrac Distance



Weighted UniFrac Distance



まとめ

- ・ 研究中の“人工肛門造設による非機能大腸が口腔内・腸内細菌叢に及ぼす影響”の概要について報告した。
- ・ サンプルの集積も良好で、徐々に解析を開始して見える見込みである。
- ・ 術後非特異性腸炎の解析結果では、腸内細菌叢の多様性が低下する傾向を認め、特定の細菌の多寡が証明された。



<p>【研究課題】</p> <p>PPI、免疫チェックポイント阻害剤などの薬剤による腸内細菌叢への影響について</p>	
平田有基 (内科学 II)	朝井章 (内科学 II)
柿本一城 (内科学 II)	竹内利寿 (内科学 II)
樋口和秀 (内科学 II)	
<p>【目的】</p> <p>Clostridium difficile 腸炎に代表されるような抗生剤が引き起こす腸炎には腸内細菌叢の変化が大きく関わっていることは、以前から広く知られている。しかし、NSAIDs やアスピリン、PPI などの抗生剤以外の薬剤が腸炎を引き起こすメカニズムに腸内細菌が、どのように関わっているのかは不明な点が多く現在様々な研究が進みつつある。今回我々は、①アスピリンを長期内服患者における PPI と②免疫チェックポイント阻害剤に着目し各薬剤の投与前後で腸内細菌叢の変化などを検討した。</p>	
<p>【方法】</p> <p>① LDA 長期内服群に PPI を追加内服して投与前、内服開始後 30 日・90 日・180 日目に便を採取し、T-RFLP 法で腸内細菌叢の解析を行う。また PPI による胃酸の抑制の度合いと腸内細菌叢の変化を比較するために胃酸抑制の指標として血清ガストリン値の推移を測定する。</p> <p>② 今までに免疫チェックポイント阻害剤の使用歴がない患者で、化学療法開始前と化学療法 2 クール終了後で次世代シーケンサーを用いて腸内細菌叢の比較を行う。また、同時に全身の免疫状態を調べるために、血液検体を用いてフローサイトメトリーで NK 細胞や制御性 T 細胞の変化なども検討する。</p>	
<p>【結果】</p> <p>① LDA 長期内服患者において PPI を追加内服する事によって腸内細菌の Lactobacillales order の割合が増加し、この変化は胃酸の抑制の程度と正の相関を示していた。</p> <p>② 現在解析途中ではあるが、免疫チェックポイント阻害剤投与後に Enterococcus などが減少傾向にあり今後免疫担当細胞の動きや薬剤の腫瘍に対する効果などを合わせて検討を行う予定である。</p>	
<p>【考察】</p> <p>① Lactobacillales order の中には口腔内の常在菌の Streptococcaceae などが多く含まれているが PPI により胃酸の分泌が抑制されることで、これらの細菌が胃内を通過し腸内で増加したと考えられる。</p> <p>② 免疫チェックポイント阻害剤の投与により腸内細菌叢が大きく変化する症例とほとんど変化しない症例があり今後腸内細菌と関連する因子を探索していく。</p>	
<p>【結論】</p> <p>今回は、薬剤起因性の腸炎を引き起こす薬剤である PPI¹⁾と免疫チェックポイント阻害剤²⁾に注目して腸内細菌叢の変化を調べた。いずれの薬剤でも腸内細菌叢の変化が起こることが示され腸炎との関与が示唆された。</p>	
<p>【文献】 1) Endo H. et al. (2014). Gastrointest Endosc 80(5): 826-834.</p> <p>2) Zitvogel L. et al.(2018). Science 23;359(6382) :1366-1370</p>	

『PPI、免疫チェックポイント阻害剤などの薬剤による腸内細菌叢への影響について』

内科学II教室 平田有基、朝井章、柿本一城、竹内利寿、樋口和秀

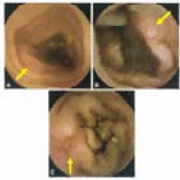
背景

- ・ Clostridium difficile腸炎に代表されるような抗生剤が引き起こす腸炎には腸内細菌叢の変化が大きく関わっていることは、以前から広く知られていた。
- ・ しかし、NSAIDsやアスピリン、PPIなどの抗生剤以外の薬剤が腸炎を引き起こすメカニズムに腸内細菌が、どのように関わっているのかは不明な点が多く、現在様々な研究が行われている。
- ・ 今回我々は、① アスピリン長期内服患者におけるPPI、② 免疫チェックポイント阻害剤に着目し投与前後の腸内細菌叢の変化等を検討した。

① アスピリン長期内服患者におけるPPI

現在までにわかっていること

LDA内服患者のカプセル内視鏡



・高齢化に伴い脳梗塞や心筋梗塞再発予防に低用量アスピリン(LDA)を継続内服する患者が増加しているがLDAは副作用として胃・十二指腸・小腸粘膜傷害をきたすことが知られている。
(J Gastroenterol (2009) 44:544-549)

PPI併用により小腸粘膜傷害は増悪する可能性がある

TABLE 6. Multivariate analysis to identify the risk factors for the development of mucosal and/or ulcer changes as compared by the Lasky scoring system in the small intestine area

Variable	OR	95% CI
Type of aspirin formulation		
Buffered aspirin	1 reference	
Enteric coated aspirin	3.28	1.13-9.52
Medication		
Thrombolysis	2.24	1.05-4.82
Acid secretions		
High doses of acid suppression	1 reference	
PPI	1.73	0.49-6.14

・胃や十二指腸の粘膜傷害予防にPPIを併用することが多いが、小腸の粘膜傷害はむしろPPI併用により増悪し、腸内細菌が関与している可能性が示唆されている。
(GASTROINTESTINAL ENDOSCOPY(2014))

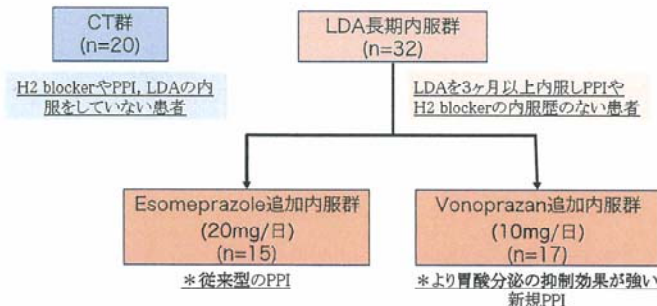
① アスピリン長期内服患者におけるPPI

研究の目的

- ・今回我々は、LDA内服患者においてPPI内服が小腸粘膜傷害を増悪させるのであれば、
- ▶ 腸内細菌叢はどのように変化しているのか
- ▶ 胃酸の抑制の度合いによってその変化に差があるのかを継続的に調べることにした。

① アスピリン長期内服患者におけるPPI

研究の方法

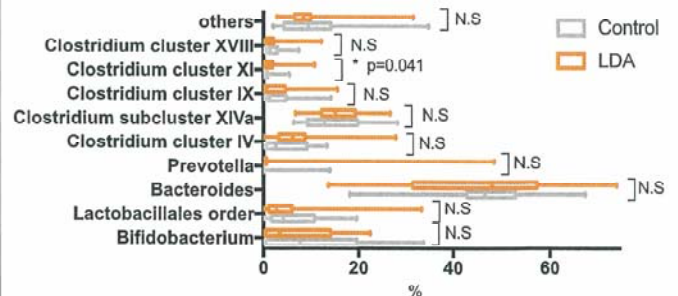


- ・各群において便を採取しT-RFLP法で腸内細菌の解析を行う。
- ・LDA長期内服群では、PPIを追加内服させ内服開始後 30日・90日・180日目に解析を行う。
- ・また、胃酸抑制の指標として同時に血清ガストリンの推移を測定する。

① アスピリン長期内服患者におけるPPI

結果①

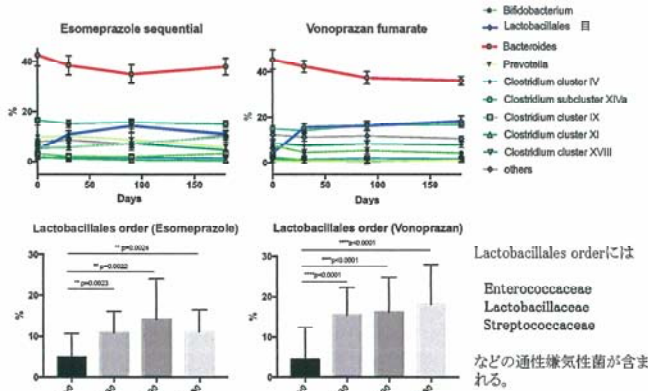
LDA内服群とCT群では腸内細菌叢の組成に大きな違いはなかった。



Clostridium clusteXIには Clostridium bartletti, Clostridium glycolicum などの酢酸を産生する菌が含まれており、二次胆汁酸を産生する菌も含まれるがどちらの群においても非常に小さい populationであった。

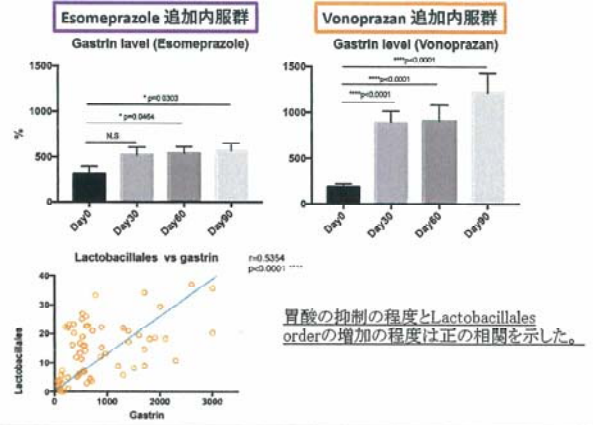
結果②

PPIの追加内服でLactobacillales orderの割合が増加した



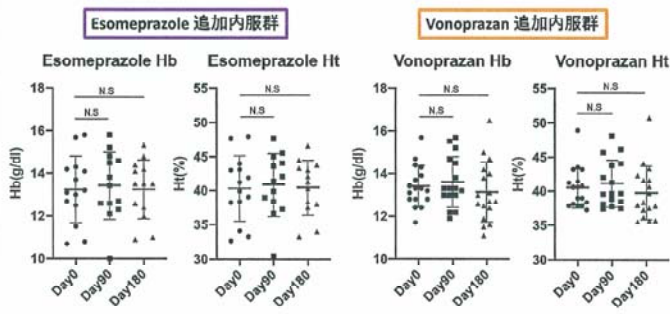
結果③

Lactobacillales orderの割合はガストリンの値と正の相関を示した



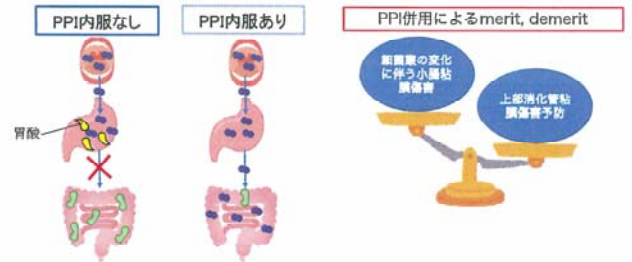
結果④

PPIの追加内服で有意な貧血の進行は認めなかった



結語

- LDA長期内服患者においてPPIを追加内服する事によって腸内細菌のLactobacillales orderの割合が増加し、この中には口腔内の常在菌のStreptococcaceaeなどが多く含まれると考えられた。
- 臨床的には、LDA内服患者においてPPIの追加内服で貧血の進行等は認めず、上部消化管の粘膜傷害の再発予防のメリットの方が、細菌叢変化による小腸粘膜傷害のリスクより大きいと考えられる。



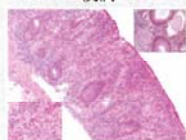
現在までにわかっていること

免疫チェックポイント阻害剤関連腸炎

炎症性腸疾患に類似した内視鏡像



粘膜下層にリンパ球の浸潤



•免疫チェックポイント阻害剤は現在様々な癌種において使用されるようになってきているが、同時に**免疫関連有害事象(irAE)**と呼ばれる副作用が問題となっている。

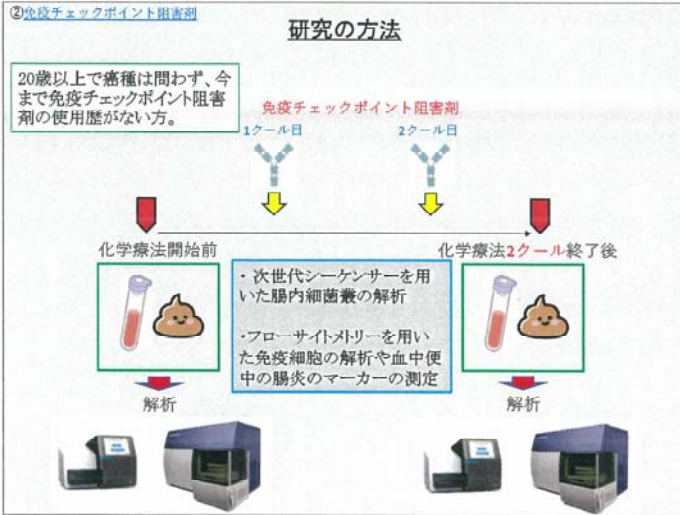
副作用の一つに腸炎が挙げられるが、そのメカニズムについては不明な点も多い。

•また近年、免疫チェックポイントの効果に腸内細菌叢の組成が関与しているとの報告も数多く出てきている。(Science 359, 1366-1370 (2018))

研究の目的

- 本研究の目的は、免疫チェックポイント阻害剤の使用前後で
 - ▶ 腸内細菌叢はどのように変化しているのか
 - ▶ 同時に腸炎のマーカーや免疫担当細胞の変化を調べることで

免疫チェックポイント阻害剤による腸炎と腸内細菌叢の変化の関連を明らかにすることである。



②免疫チェックポイント阻害剤 途中経過

ID	Initial	Sex	Age	Drug	First Administration	Primary lesion	stage
2152462	M.A	F	78	Nivolumab(3rd)	2018/3/20	LK (#NSCLC)	IV (cT2aN2M1a)
7383122	K.H	M	66	Nivolumab(3rd)	2018/3/27	LK (#NSCLC)	IV (cT4N3M1)
7139879	T.Y	F	56	Atezolizumab(4th)	2018/5/15	LK (#NSCLC)	IV(cT3N2M1)
5467822	K.O	M	76	Nivolumab(3rd)	2018/8/30	MK	III A(cT2N2M0)
7427147	N.O	M	75	Pembrolizumab(1st)	2018/11/29	LK (#NSCLC)	IV(cT4N3M1a)
7218635	Y.H	F	75	Atezolizumab(4th)	2018/12/18	LK (#NSCLC)	IV
3358001	K.S	M	67	Pembrolizumab(1st)	2018/12/27	LK (#NSCLC)	IV
8857799	M.M	M	69	Pembrolizumab(CDDP+PEM+)	2019/1/11	LK (#NSCLC)	IV
7251119	K.O	M	58	Pembrolizumab(3rd)	2019/1/15	LK (#NSCLC)	IV
7412200	A.W	M	63	Nivolumab(3rd)	2019/1/8	MK	IV
7624704	T.S	M	81	Pembrolizumab(1st)	2019/2/19	LK (#NSCLC)	IV
7415180	M.K	M	68	Nivolumab(3rd)	2019/3/1	MK	IV
4069555	H.F	M	74	Atezolizumab(2nd)	2019/3/14	LK (#NSCLC)	IV
7376692	K.M	M	74			LK (#NSCLC)	IV
991210	Y.T	M	71	Nivolumab(3rd)	2019/3/29	MK	IV
7578151	T.N	M	70	Nivolumab(3rd)	2019/4/26	食道胃接合部癌	IV
7490824	K.N	M	91	Nivolumab(3rd)	2019/5/6	MK	IV
7554744	H.J	M	50	Nivolumab(3rd)	2019/5/23	MK	IV
7058895	K.T	F	65	Nivolumab(3rd)	2019/8/19	MK	IV
3126303	K.T	M	70	Nivolumab(3rd)	2019/8/23	MK	IV
6533171	H.H	M	77	Nivolumab(3rd)	2019/9/13	MK	IV

現在、呼吸器内科や当科ケモグループのご協力のもと症例集積中

