

國立陽明交通大學

統計學研究所

碩士論文

Institute of Statistics

National Yang Ming Chiao Tung University

Master Thesis

口腔微生物組與譫妄症及吸入性肺炎之因果關係—

以口腔鱗狀細胞癌患者為例

Causal Relationship Between Oral Microbiome and
Delirium and Aspiration Pneumonia in Patients with Oral
Squamous Cell Carcinoma

研究生：朱嘉翎 (Chu, Chia-Ling)

指導教授：林聖軒 (Lin, Sheng-Hsuan)

中華民國一一四年六月

June 2025

口腔微生物組與譫妄症及吸入性肺炎之因果關係—

以口腔鱗狀細胞癌患者為例

Causal Relationship Between Oral Microbiome and Delirium
and Aspiration Pneumonia in Patients with Oral Squamous
Cell Carcinoma

研究生：朱嘉翎

Student：Chu, Chia-Ling

指導教授：林聖軒

Advisor：Dr. Sheng-Hsuan, Lin



A Thesis

Submitted to Institute of Statistics
National Yang Ming Chiao Tung University
In partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master
in
Statistics

June 2025

Taiwan, Republic of China

中華民國 一一四年六月

致 謝

感謝這段日子曾給予我支持與協助的所有人，讓我能夠順利完成碩士論文。首先，誠摯感謝我的指導教授林聖軒教授，從研究方向的規劃到細節上的修正，都提供了我許多寶貴的建議，並不斷地給予我鼓勵與肯定。我也特別感謝傅詩宸教授在微生物相關知識上的補充，並協助完成本研究中的微生物資訊分析。本研究使用之資料已通過長庚醫療財團法人人體試驗倫理委員會審查（IRB 案號：202400822B0）。此外，傅教授亦擔任本研究的口試委員，其所提出的問題讓我重新思考資料分析在研究中的角色；也感謝王秀瑛教授百忙之中撥冗擔任口試委員，並針對論文內容提出極具建設性的建議，使本篇論文更加嚴謹與完整。

在這兩年的研究所生活中，我也有許多想要感謝的人。感謝彥霖學長於研究期間的協助，讓我少走了許多彎路；感謝同為林教授研究室的品瑄，經常與我一起討論研究進度，讓繁忙的日子多了些樂趣；也謝謝那些在求學過程中陪伴過我的朋友，讓我平凡的碩士生活增添了許多色彩。最後，我要特別感謝我的家人，始終無條件支持我，讓我可以無後顧之憂地專心完成學業。謹以此文，感謝所有在這段旅程中陪伴我的每一位。

朱嘉翎 謹致於

國立陽明交通大學 統計學研究所

中華民國一一四年六月

中文摘要

口腔鱗狀細胞癌（oral squamous cell carcinoma）為常見的口腔惡性腫瘤。過去文獻表明，口腔微生物失衡可能增加術後併發症的風險，但口腔微生物對吸入性肺炎與譫妄症的因果關係仍有待確認。本研究納入來自長庚紀念醫院的 181 名 OSCC 患者的口腔沖洗液樣本，透過控制可能的干擾因子及中介因子，分析 alpha 及 beta 多樣性，並識別與兩種術後併發症相關的重要菌屬及代謝途徑。結果顯示，口腔微生物的組成皆會影響兩種術後併發症，但其作用機制有所不同。在吸入性肺炎方面，吸入性肺炎組的 alpha 多樣性顯著較低，且 beta 多樣性亦存在顯著差異，並識別出 21 個具有顯著差異的菌屬。功能預測結果顯示，分層分析後仍有 2 條代謝途徑具有顯著差異。在譫妄症方面，譫妄症組的 alpha 多樣性顯著較低，且 beta 多樣性也具有顯著差異，並識別出 11 個具有顯著差異的菌屬。功能預測結果顯示，分層分析後仍有 1 條代謝途徑具有顯著差異。這些發現表明，OSCC 患者的口腔微生物組可能透過不同機制影響吸入性肺炎與譫妄症的發生。未來的臨床干預措施可聚焦於調控口腔微生物組，降低術後併發症的發生率，以改善患者的術後預後與生活品質。

關鍵字：口腔鱗狀細胞癌、口腔微生物組、功能預測、吸入性肺炎、譫妄症、因果推論

英文摘要

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a common malignant tumor of the oral cavity. Previous studies have suggested that dysbiosis of the oral microbiome may increase the risk of postoperative complications; however, the causal relationship between the oral microbiome and aspiration pneumonia or delirium remains unclear. This study included oral rinse samples from 181 OSCC patients at Chang Gung Memorial Hospital. By controlling for potential confounders and mediators, we analyzed alpha and beta diversity and identified key bacterial genera and metabolic pathways associated with these complications. The results indicated that the composition of the oral microbiome affected both complications, but through distinct mechanisms. Regarding aspiration pneumonia, the aspiration pneumonia group had significantly lower alpha diversity and significant differences in beta diversity, with 21 bacterial genera showing significant differences. Functional prediction revealed two metabolic pathways that remained significantly different after stratified analysis. For delirium, the delirium group had significantly lower alpha diversity and significant differences in beta diversity, with 11 bacterial genera showing significant differences. Functional prediction results showed that one metabolic pathway remained significantly different after stratified analysis. These results suggest that the oral microbiome may influence the occurrence of aspiration pneumonia and delirium through different mechanisms. Future clinical interventions may focus on modulating the oral microbiome to reduce postoperative complications and improve prognosis for patients.

Keywords: oral squamous cell carcinoma, oral microbiome, functional prediction, aspiration pneumonia, delirium, causal inference

目 錄

中文摘要	i
英文摘要	ii
目 錄	iii
圖目錄	v
表目錄	vi
第一章、 前言	1
1.1 研究動機	1
1.1.1 口腔鱗狀細胞癌介紹	1
1.1.2 口腔微生物之簡介	1
1.1.3 口腔微生物與吸入性肺炎之關係	2
1.1.4 口腔微生物與譫妄症之關係	3
1.2 研究目的	4
1.3 論文架構	4
第二章、 研究方法	5
2.1 研究對象及資料蒐集方法	5
2.2 口腔微生物組資料前處理	5
2.3 統計分析方法	6
2.3.1 人口統計特徵	6
2.3.2 Alpha 多樣性及 Beta 多樣性	7
2.3.3 豐度差異分析	8
2.3.4 功能預測	9
第三章、 研究結果	10
3.1 口腔微生物組與吸入性肺炎之因果關係	10

3.1.1 人口統計特徵結果	10
3.1.2 Alpha 多樣性及 Beta 多樣性結果	11
3.1.3 豐度差異分析結果	12
3.1.4 功能預測結果	15
3.2 口腔微生物組與譫妄症之因果關係	16
3.2.1 人口統計特徵結果	16
3.2.2 Alpha 多樣性及 Beta 多樣性結果	17
3.2.3 豐度差異分析結果	18
3.2.4 功能預測結果	21
第四章、討論	23
4.1 口腔微生物組與吸入性肺炎之因果關係	23
4.1.1 口腔微生物組之結果探討	23
4.1.2 功能預測之結果探討	24
4.2 口腔微生物組與譫妄症之因果關係	24
4.2.1 口腔微生物組之結果探討	25
4.2.2 功能預測之結果探討	26
4.3 研究限制	27
4.4 未來展望	27
參考資料	28

圖目錄

圖（一）、口腔微生物組與吸入性肺炎之因果關係圖	10
圖（二）、有無吸入性肺炎兩組患者之 alpha 多樣性指標	12
圖（三）、有無吸入性肺炎兩組患者之 beta 多樣性指標	12
圖（四）、有無吸入性肺炎兩組患者之菌屬層級相對豐度差異	13
圖（五）、有無吸入性肺炎兩組患者之菌屬層級主要組成	14
圖（六）、有無吸入性肺炎兩組患者之菌屬層級主要組成中顯著菌屬	14
圖（七）、有無吸入性肺炎兩組患者之功能預測（總臨床分期 $\leq$ 第3期）	15
圖（八）、有無吸入性肺炎兩組患者之功能預測（總臨床分期 $>$ 第3期）	16
圖（九）、口腔微生物組與譫妄症之因果關係圖	16
圖（十）、有無譫妄症兩組患者之 alpha 多樣性指標	18
圖（十一）、有無譫妄症兩組患者之 beta 多樣性指標	18
圖（十二）、有無譫妄症兩組患者之菌屬層級相對豐度差異	19
圖（十三）、有無譫妄症兩組患者之菌屬層級主要組成	20
圖（十四）、有無譫妄症兩組患者之菌屬層級主要組成中顯著菌屬	20
圖（十五）、有無譫妄症兩組患者之功能預測（ICU 住院時長 $\leq$ 7 天）	21
圖（十六）、有無譫妄症兩組患者之功能預測（ICU 住院時長 $>$ 7 天）	22

表 目 錄

表（一）、有無吸入性肺炎兩組患者之人口統計特徵…………… 11

表（二）、有無譫妄症兩組患者之人口統計特徵…………… 17



第一章、前言

1.1 研究動機

1.1.1 口腔鱗狀細胞癌介紹

口腔鱗狀細胞癌（oral squamous cell carcinoma, OSCC）為全球第六常見的口腔惡性腫瘤，每年新增病例超過 500,000 人[1]，也是口腔癌中最常見的類型，約佔所有病例的 90%[2]。由於大多數患者在疾病晚期才被確診，導致存活率顯著降低[3]。研究顯示，口腔癌的整體五年存活率僅 36.1%，且隨著癌症分期的增加，五年存活率大幅下降（第 1 期為 72%、第 2 期為 38.9%、第 3 期為 26.7%、第 4 期為 11.8%）。除了癌症分期外，影響存活率的主要因素還包括腫瘤大小、淋巴結轉移、是否接受手術治療及咀嚼檳榔[4]。

術後併發症對患者健康造成顯著的負面影響，常導致住院時間延長、醫療費用增加，並可能提高發病率與死亡率[5]。其中，吸入性肺炎與譫妄症皆為常見的術後併發症，對患者預後影響重大。吸入性肺炎的術後發生率高達 30.6% [6]，不僅會導致加護病房（intensive care unit, ICU）入院率與再入院率的增加[7]，在頭頸部重建手術患者中，若出現肺部併發症，其死亡率更是高達 12.8% [8]。另一方面，譫妄症每年造成高達 329 億美元的醫療成本[9]。儘管其未必會直接增加圍手術期的死亡率，卻與整體死亡率、住院時間、機械通氣時間及認知障礙發生率的增加有關[10, 11]。此外，譫妄症與六個月內死亡率增加 3.2 倍及住院時間延長 2 倍相關[12]，且可能導致永久性功能受限與生活品質下降[13]。

1.1.2 口腔微生物之簡介

近年來，人類微生物組與身體狀況的密切關聯而受到科學界的高度關注。微生物組由居住在人體各部位的多種微生物群落及其所攜帶的基因與功能途徑所構成，在維持宿主健康方面扮演著極為重要的角色[14]。微生物組的失衡不僅與

腸道疾病（如結直腸癌）密切相關[15-17]，也與神經退行性疾病（如阿茲海默症與帕金森氏症）有關[18-20]。因此，理解並恢復微生物組的平衡對於疾病預防極具潛力，使微生物組研究成為現代醫學中的重要領域[14]。口腔微生物為僅次於腸道的第二大微生物群，涵蓋細菌、真菌、病毒及原生動物[21]。這些微生物群由 600 多種菌門組成，主要包括厚壁菌門(*Firmicutes*)、變形菌門(*Proteobacteria*)、擬桿菌門(*Bacteroidetes*)、放線菌門(*Actinobacteria*)、梭桿菌門(*Fusobacteria*)及 TM7。口腔內的微生物可定植於牙齒、齦溝、舌頭、頰黏膜、硬顎、軟顎及扁桃體等部位，容易受到溫度、飲食、pH 值及進食習慣等因素影響[22,23]。因此，探討不同疾病狀態下口腔微生物的變化，有助於深入理解疾病相關的機制與代謝變化，為未來的治療策略提供新方向[21]。

1.1.3 口腔微生物與吸入性肺炎之關係

由於口腔與呼吸道之間的解剖學聯繫，使口腔微生物更容易進入呼吸系統，而引發各種肺部併發症。對於晚期口腔癌患者而言，由於手術切除範圍較大，重建後的口腔結構變化可能加劇吞嚥困難，進一步提高吸入性肺炎的風險。過去多項研究表明，口腔及舌苔所採集到的微生物皆與肺炎有著密切關係[24-26]。一項針對 65 歲以上長期住院患者及養老院居民的研究，根據 T-RFLP 圖譜將舌苔微生物分為四組（A、B、C 和 D），並採用多變量調整的 Cox 比例風險迴歸分析。研究結果指出，C 組（風險比為 4.0，95%信賴間為 1.1 至 15.1）與 D 組（風險比為 4.9，95%信賴區間為 1.2 至 21.1）表現出顯著較高的肺炎風險；隨著隨訪時間增加，兩組的累積發病率皆顯著高於 A 組，其 p-value 分別為 0.04 與 0.03。其中，A 組的 TRF 主要組合與鏈球菌屬(*Streptococcus*)相關，次要組合與羅氏菌屬(*Rothia*)相關；B 組未對應特定物種；C 組和 D 組則與普雷沃氏菌屬(*Prevotella*)、韋榮球菌屬(*Veillonella*)及密螺旋體屬(*Treponema*)等菌屬相關[24]。除此之外，金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella*

pneumoniae)、綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 及陰溝腸桿菌 (*Enterobacter cloacae*) 是牙菌斑中檢測到的主要潛在呼吸道病原菌，這些細菌可能通過妨礙宿主的防禦機制，使受感染的細菌難以被清除，進而引發吸入性肺炎[27]。此外，Terpenning 等人指出，金黃色葡萄球菌 (勝算比為 7.4，95%信賴區間為 1.8 至 30.5)、遠緣鏈球菌 (*Streptococcus sobrinus*) (勝算比為 6.2，95%信賴區間為 1.4 至 27.5) 及牙齦卟啉單胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) (勝算比為 4.2，95%信賴區間為 1.6 至 11.3) 為吸入性肺炎的顯著風險因素[28]。儘管過去已有許多文獻探討口腔與肺部疾病之間的關聯，但針對吸入性肺炎的相關研究多著重於口腔衛生狀況[29-31]，或透過牙菌斑與唾液樣本進行特定菌種的定向分析[27,28]，至今仍缺乏運用高通量微生物組技術，全面探討口腔微生物組與吸入性肺炎之間關係的研究。

1.1.4 口腔微生物與譫妄症之關係

儘管過去已有許多研究探討了微生物組在各種疾病中的角色，但針對口腔微生物與譫妄症之間的研究較為有限。Nakatani 等人的研究表示，口腔衛生不良與術前認知功能不佳呈正相關，其勝算比為 1.19 (95%信賴區間為 1.2 至 1.40)；術前認知功能不佳也與術後譫妄症呈正相關，其勝算比為 4.91 (95%信賴區間為 1.90 至 12.1) [32]。這些結果間接表明口腔衛生不良可能與術後譫妄症有關。一種可能的解釋是，口腔衛生不良源於咀嚼功能受損，而引發營養不良和神經傳導物質 (如乙酰膽鹼) 的減少，造成大腦血流降低，最終導致認知功能障礙[33]。此外，咀嚼過程會活化前額葉皮層，該區域主要負責邏輯思維及其他認知功能[34]。因此，口腔衛生不良可能對認知功能產生負面影響，進而增加譫妄症的風險。此外，關於胃腸微生物與譫妄症之間的研究也同樣有限。一項研究表明，胃腸道中狄氏副擬桿菌 (*Parabacteroides distasonis*) 的濃度與術後譫妄症之間呈正相關，其勝算比為 2.13 (95%信賴區間為 1.09 至 4.17) [35]。

1.2 研究目的

由上述文獻可知，目前尚未有研究全面探討 OSCC 患者中，口腔微生物組與吸入性肺炎及譫妄症的因果關係，本研究首次對此進行分析。後續研究將採用來自長庚紀念醫院所蒐集的資料，並分為兩大主題進行探討：主題一為探討口腔微生物組與吸入性肺炎之因果關係，基於先前研究，我們假設口腔微生物組的變化會影響術後是否有吸入性肺炎的發生；主題二為探討口腔微生物組與譫妄症之因果關係，我們假設口腔微生物組的失衡可能會增加譫妄症的發生風險。由於本研究著重於因果關係的討論，需控制干擾因子及中介因子。在因果推論研究中，干擾因子是指會同時影響自變數及應變數的變量；中介因子則指會被自變數影響並同時影響應變數的變量。若不控制這些因子，可能會導致結果不準確。透過瞭解微生物相關機制對吸入性肺炎及譫妄症的影響，期許可以為未來的治療策略提供新方向，減少相關併發症的發生，改善患者的臨床預後。

1.3 論文架構

在接下來的章節中，將分別介紹口腔微生物組資料的分析方法及結果。首先，第二章將依序介紹研究對象及資料蒐集方法、口腔微生物組資料前處理以及相關的統計分析方法，像是人口統計特徵、alpha 多樣性及 beta 多樣性、豐度差異分析及功能預測。第三章將分為兩大部份，分別闡述兩個主題的統計分析結果。第四章將進一步討論研究結果，並說明本研究的限制以及對 OSCC 患者所帶來的臨床貢獻。

第二章、研究方法

2.1 研究對象及資料蒐集方法

本研究採用來自長庚紀念醫院 203 名 OSCC 患者的口腔沖洗液樣本，該樣本先前已通過長庚醫療財團法人人體試驗倫理委員會審核，IRB 案號為 102-5685A3(201305685A3)。樣本蒐集時間為 2014 年 2 月至 2015 年 5 月，並從醫療紀錄中獲取了過去 5 年的隨訪資料。口腔沖洗液樣本是在患者確診後 1 至 3 週內蒐集，患者使用 30 毫升無菌生理食鹽水漱口 30 秒，並吐入 50 毫升無菌管中，再將樣本以每分鐘 6000 轉離心 30 分鐘，提取細胞樣本並保存在 -80°C 的環境中。在蒐集樣本前，已獲得患者或其家屬書面知情同意，且所有資料均已轉化為無法辨識參與者個人資料之編號，並確保患者均未接受抗生素治療。此外，若患者存在多個腫瘤而造成重複觀測值，僅保留腫瘤臨床分期中最嚴重的紀錄。最後，在排除未進行手術的患者後，剩餘 181 名患者（166 位男性，15 位女性）根據住院期間是否有發生吸入性肺炎或譫妄症，將患者分為兩組。

2.2 口腔微生物組資料前處理

本研究所使用之 DNA 定序資料來自 Yang 等人的研究[36]。其中，DNA 萃取是利用 QIAamp DNA 微生物組套件進行分離，並透過 Qubit 高靈敏度 dsDNA 分析以確定純化 DNA 的濃度與品質。在定序方面，通過聚合酶連鎖反應（Polymerase Chain Reaction, PCR），針對 16S rRNA V3-V4 區域進行放大，從每個樣本中構建引物文庫，並添加 Illumina 接頭序列。文庫經過初步的 PCR 擴增、純化、索引與再次純化後，使用 HT DNA 高靈敏度 LabChip 套件驗證，最後以 MiSeq 系統進行高通量定序，更詳細之流程可參考 Yang 等人的研究[36]。

在微生物資訊分析上，本研究皆使用 QIIME2 v2023.2 進行處理。首先，利用 cutadapt v4.2[37]去除接頭（adapters）及引物（primers）序列，再透過 vsearch

v2.22.1[38]合併成對的序列讀數 (reads)，並將重疊區域最小長度設定為 5，同時過濾掉 PHRED 分數 (phred quality score) 低於 20 的序列。接著利用 Deblur v1.1.1 [39] 進行序列的去噪處理，並將序列長度裁剪至 427 個鹼基對 (base pair)。最後基於 scikit-learn 的單純貝氏分類器 (naive Bayes classifier) 進行分類，該分類器使用 Silva v138 (以 99%相似度聚類) 擴增子序列變體 (amplicon sequence variant, ASV) 全長序列中的 V3-V4 區域進行訓練，以利後續分析。為了探討口腔微生物組對人體代謝功能的影響，本研究使用 PICRUSt2[40] 進行分析。PICRUSt2 是一種基於 16S rRNA 擴增子數據的生物資訊學工具，可推測樣本中微生物可能攜帶的功能基因，並評估不同微生物群落的代謝途徑豐度。接著，利用京都基因與基因組百科全書 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 提供的功能性分類系統，將微生物功能基因對應至 KO (KEGG Orthology) 編號，並轉換為對應的常見功能名稱，以提升結果的可讀性。

2.3 統計分析方法

後續的分析將根據前述的兩個主題分別進行，並在第 3.1 章與第 3.2 章中呈現研究結果。在主題一中，將根據是否發生吸入性肺炎將患者分為兩組進行分析；在主題二中，則根據是否有譫妄症將患者分為兩組進行分析。

2.3.1 人口統計特徵

本研究欲比較的人口特徵可分為四大類：第一部分為基本資料，包含性別、年齡、過去習慣及病史等；第二部分為癌症相關資訊，包含腫瘤部位、腫瘤個數及 TNM (Tumor, Node, Metastasis) 分期等；第三部分為術後相關資訊，包含顯微手術時血管阻塞、吸入性肺炎、傷口感染、ICU 住院時長及譫妄症等；第四部分為復發及死亡狀態，包含死因、死亡時間、無病生存期及最後追蹤存活狀態等。為比較上述變數於不同族群間的差異，連續變數採用無母數方法中的 Kruskal-

Wallis 檢定 (Kruskal-Wallis test)，類別變數則採用卡方檢定 (chi-squared test)。上述分析皆利用 R 套件的 tableone 0.13.2 的 CreateTableOne 函數進行。

2.3.2 Alpha 多樣性及 Beta 多樣性

Alpha 多樣性主要用於呈現單一樣本中的微生物豐富度 (richness) 及均勻度 (evenness)，豐富度即為微生物種類的數目，而均勻度則指各種類的分布是否平均。本研究使用了四個常見的指標來評估 alpha 多樣性，分別為 Observed、Chao1[41]、Shannon[42]與 Simpson[43]。前兩者僅基於豐富度的概念進行估計，當數值越大代表 alpha 多樣性越高。其中，Observed 代表的是 ASV 的種類數量，Chao1 則進一步考慮了稀有種，並增加其權重；後兩者則同時考慮了豐富度及均勻度，數值越大亦表示 alpha 多樣性越高。上述指標的計算皆利用 R 套件的 phyloseq 1.50.0 的 estimate_richness 函數進行分析。為比較兩組患者之間的多樣性差異，將使用變異數分析 (analysis of variance, ANOVA) 進行檢定，該檢定利用 R 套件的 stats 4.4.2 的 aov 函數進行分析。結果則透過箱型圖呈現，以視覺化兩組樣本間的數值差異。

Beta 多樣性主要用於評估不同樣本間的群落組成差異。本研究首先計算樣本間的距離矩陣，接著利用無母數方法中的置換多元變異數分析 (permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA) 進行檢定[44]，最後透過主座標分析 (principal coordinates analysis, PCoA) 呈現其差異[45]。本研究將使用三種常見方法計算距離矩陣，分別為坎培拉距離 (Canberra distance) [46]、未加權 UniFrac 距離 (unweighted unique fraction distance) [47]以及加權 UniFrac 距離 (weighted unique fraction distance) [48]。其中，坎培拉距離在計算時不考慮系統發育樹，而未加權及加權的 UniFrac 距離則會考慮，兩者又依是否有採計族群規模做為區分。上述分析分別使用 R 套件的 phyloseq 1.50.0 的 ordinate 函數與 vegan 2.6.4 的 adonis2 函數進行。

2.3.3 豐度差異分析

在 ASV 表格中，各數值代表每個 ASV 在樣本中的絕對豐度。由於各樣本的讀數總和不一致，為了使不同樣本間的豐度具可比性，同時保持資料的解釋性，本研究採用總和縮放（total-sum scaling, TSS）對資料進行規一化[49]。該方法將每個樣本的讀數總和標準化為相同數值，本研究將讀數總和標準化為 1。意即將每個 ASV 在該樣本中的絕對豐度除以該樣本的總豐度，以轉換為相對豐度。為檢定兩組患者的相對豐度是否存在差異，將使用相對豐度進行豐度差異分析（differential abundance analysis, DA），並參考 Hill-Burns 等人之研究，僅保留出現在至少 10%樣本中的菌屬進行分析[18]。考量到微生物數據通常具有過度離散的特性，本研究將採用廣義線性模型（generalized linear model）進行建模，並將指數族設置為負二項分佈[18]。此外，由於數據中存在大量零值，亦同時引入零膨脹模型（zero-inflated model）[50]以提升擬合表現。上述檢定利用 R 套件的 glmmTMB 1.1.10 的 glmmTMB 函數進行分析。

分析結果將以火山圖（volcano plot）呈現，X 軸為倍數變化（fold change）的以 2 為底的對數值，Y 軸為 p-value 的以 10 為底的負對數值。倍數變化的計算方式是將各 ASV 在吸入性肺炎組（或譫妄症組）的平均相對豐度除以無吸入性肺炎組（或無譫妄症組）的平均相對豐度。為了避免無吸入性肺炎組（或無譫妄症組）的平均相對豐度為 0 的狀況發生，導致倍數變化趨近於無限大，將對所有相對豐度加上一個極小且大於 0 的常數，稱為偽計數（pseudocount）[51]，本研究將以所有相對豐度的最小值除以 100 作為偽計數。此外，為進一步比較兩組患者菌屬層級之主要組成是否存在差異，將參考 Yang 等人的方法，僅保留至少在任一組中相對豐度超過 1%的 ASV 進行分析[36]。結果將以堆疊長條圖（stacked bar chart）呈現，並針對顯著菌屬進行生物學意義探討。

2.3.4 功能預測

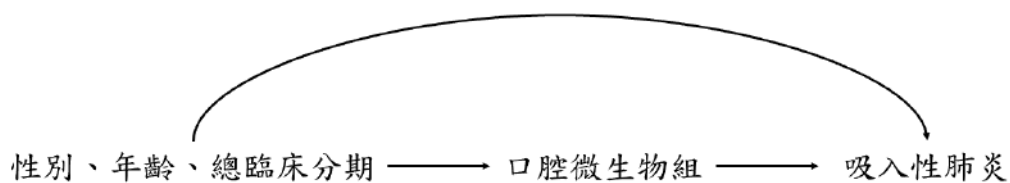
為比較兩組患者代謝功能途徑之豐度是否存在差異，將參考 Hill-Burns 等人的研究方法，僅保留出現在至少 10% 樣本中的代謝功能途徑進行分析[18]。利用相對豐度進行 White's 無母數 t 檢定 (White's non-parametric t-test) [52]，並透過置換過程 (permutation process) 進行 1000 次置換，以移除傳統 t 檢定所需的常態假設。此外，為降低偽陽性率 (False Positive Rate) 的發生，採用 Storey 錯誤發現率 (Storey false discovery rate) 對 p-value 進行校正[53]，並將校正後的 q-value 顯著水準設置為 0.05。兩組患者間比例差異的信賴區間則是透過自助法 (bootstrap method) 進行估計。上述分析是利用 STAMP (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles) [54] 進行。由於該方法無法同時控制多個干擾因子，因此本研究將根據過去的研究背景，選擇對譫妄症與吸入性肺炎影響最大的變數進行分層分析 (stratified analysis)。

第三章、研究結果

3.1 口腔微生物組與吸入性肺炎之因果關係

3.1.1 人口統計特徵結果

圖（一）為口腔微生物組、吸入性肺炎及相關干擾因子的因果關係圖。本研究將對性別、年齡及總臨床分期三項可能影響結果的干擾因子進行控制。這些因素可能同時影響口腔微生物群的組成與吸入性肺炎的發生風險，若不加以控制，可能導致分析結果產生偏誤。因此，為確保研究結果能真實反映口腔微生物組與吸入性肺炎之間的因果關係，後續分析皆會對上述變數進行控制。本研究首先比較無吸入性肺炎（N=162）與吸入性肺炎（N=19）兩組患者的人口統計特徵，結果如圖（一）所示。由於變數較多，本研究僅列出與口腔微生物組及吸入性肺炎相關的變數。結果顯示，兩組患者在性別、抽菸、飲酒及咀嚼檳榔等生活習慣上無顯著差異，但在年齡與總臨床分期上則存在顯著差異，p-value 分別為 0.016 與 0.040。這表明吸入性肺炎的發生可能與年齡增長及較晚期的總臨床分期相關，進一步支持在後續分析中對這些變數進行控制的必要性。



圖（一）、口腔微生物組與吸入性肺炎之因果關係圖

表（一）、有無吸入性肺炎兩組患者之人口統計特徵

	無吸入性肺炎 (N=162)	吸入性肺炎 (N=19)	p-value
性別			
女性	15 (9.3%)	0 (0.0%)	0.345
男性	147 (90.7%)	19 (100.0%)	
年齡			
平均值（標準差）	52.695 (9.470)	58.465 (12.125)	0.016
總臨床分期			
第 1 期至第 3 期	96 (59.3%)	6 (31.6%)	0.040
第 4 期	66 (40.7%)	13 (68.4%)	
抽菸			
否	33 (20.4%)	3 (15.8%)	0.865
是	129 (79.6%)	16 (84.2%)	
飲酒			
否	51 (31.5%)	4 (21.1%)	0.502
是	111 (68.5%)	15 (78.9%)	
咀嚼檳榔			
否	43 (26.5%)	6 (31.6%)	0.846
是	119 (73.5%)	13 (68.4%)	

3.1.2 Alpha 多樣性及 Beta 多樣性結果

針對兩組患者的口腔微生物組進行 alpha 多樣性分析，結果如圖（二）所示。在 Observed 及 Chao1 指標上，吸入性肺炎組的 alpha 多樣性皆顯著較低，p-value 分別為 0.017 及 0.015；而在 Shannon 及 Simpson 指標上則無顯著差異，p-value 分別為 0.629 及 0.845。進一步分析 beta 多樣性，結果如圖（三）所示。基於 Canberra 及 unweighted UniFrac 距離，兩組患者間存在顯著差異，p-value 分別為 0.022 及 0.011；而基於 weighted UniFrac 距離則未達顯著差異，p-value 為 0.069。PCoA 視覺化結果顯示，基於 Canberra 距離，前兩個維度分別解釋了總變異的 2.5%及 2.1%；基於 unweighted UniFrac 距離，分別解釋了總變異的 7%及 4.1%；基於 weighted UniFrac 距離，則分別解釋了總變異的 14.9%及 9.9%。

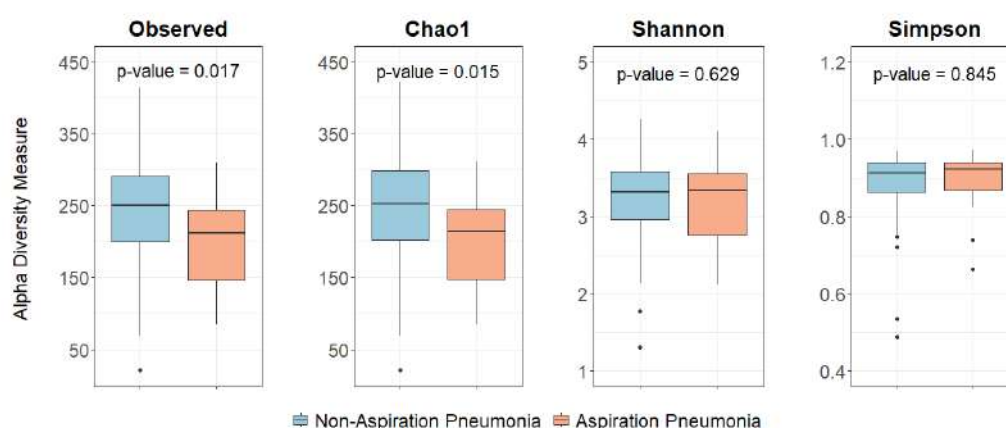


圖 (二)、有無吸入性肺炎兩組患者之 alpha 多樣性指標

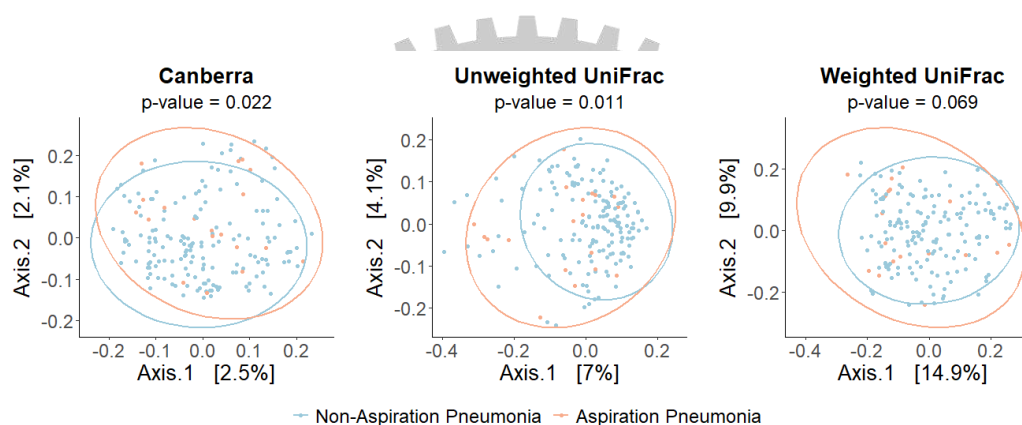


圖 (三)、有無吸入性肺炎兩組患者之 beta 多樣性指標

3.1.3 豐度差異分析結果

對於所檢測到的 3,658 個 ASV，分別可對應到生物分類層級中的 1 個界、13 個門、22 個綱、55 個目、91 個科、178 個屬以及 391 個種。在保留出現在至少 10% 樣本中的菌屬後，針對 105 個菌屬，比較兩組患者之相對豐度，結果如圖 (四) 所示。結果顯示，有 21 個菌屬具有顯著差異，其中 11 個菌屬在吸入性肺炎組中顯著較高，分別為 *Bulleidia* (p-value 為 <0.001)、*Howardella* (p-value 為 <0.001)、*Leptotrichia* (p-value 為 <0.001)、*Parvimonas* (p-value 為 0.002)、*Centipeda* (p-value 為 0.003)、*Scardovia* (p-value 為 0.031)、*[Eubacterium]_saphenum_group* (p-value 為 0.033)、*Family_XIII_UCG-001* (p-value 為 0.042)、*Kingella* (p-value

為 0.047)、*Erysipelotrichaceae_UCG-006* (p-value 為 0.048) 以及 *Fusobacterium* (p-value 為 0.049); 其餘 10 個菌屬則在無吸入性肺炎組中顯著較高, 分別為 *Lautropia* (p-value 為 <0.001)、*W5053* (p-value 為 <0.001)、*Tannerella* (p-value 為 0.018)、*Desulfobulbus* (p-value 為 0.023)、*Veillonella* (p-value 為 0.030)、*Halomonas* (p-value 為 0.030)、*Haemophilus* (p-value 為 0.036)、*Odoribacter* (p-value 為 0.038)、*Phocaeicola* (p-value 為 0.040) 以及 *Filifactor* (p-value 為 0.042)。

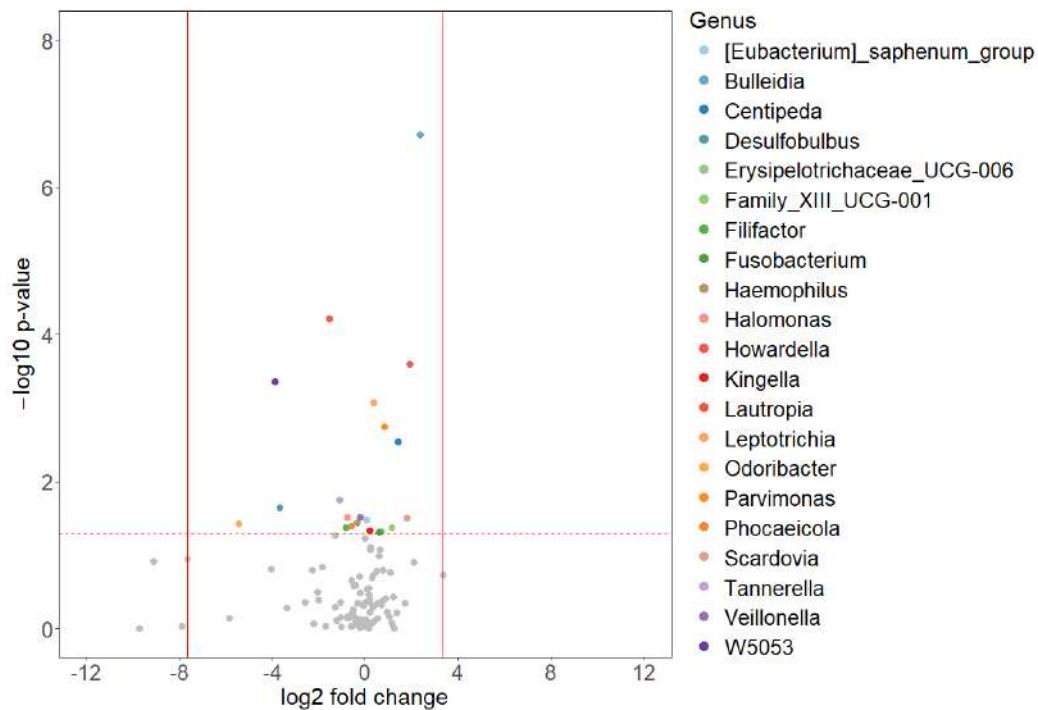


圖 (四)、有無吸入性肺炎兩組患者之菌屬層級相對豐度差異

在菌屬層級的主要組成中, 有 16 個菌屬至少在任一組所佔比例超過 1%, 這些菌屬約佔所有微生物組的 86%, 結果如圖 (五) 所示。以吸入性肺炎組為例, 主要菌屬為 *Streptococcus* (22.06%) 與 *Neisseria* (17.30%), 其次依序為 *Veillonella* (7.51%)、*Gemella* (6.63%)、*Haemophilus* (5.61%)、*Peptostreptococcus* (4.70%)、*Parvimonas* (4.39%)、*Fusobacterium* (3.63%)、*Leptotrichia* (3.37%)、

Rothia (3.12%)、*Granulicatella* (2.32%)、*Aggregatibacter* (1.13%)、*Prevotella* (1.00%)、*Solobacterium* (1.00%)、*Actinobacillus* (0.94%)、*Porphyromonas* (0.94%)、*Filifactor* (0.69%)。在主要組成中，有 5 個菌屬具有顯著差異，其中 2 個菌屬在吸入性肺炎組中顯著較高，分別為 *Parvimonas* (p-value 為 0.002) 及 *Fusobacterium* (p-value 為 0.049)；其餘 3 個菌屬則在無吸入性肺炎組中顯著較高，分別為 *Leptotrichia* (p-value 為 <0.001)、*Haemophilus* (p-value 為 0.036) 以及 *Veillonella* (p-value 為 0.038)，如圖 (六) 所示。

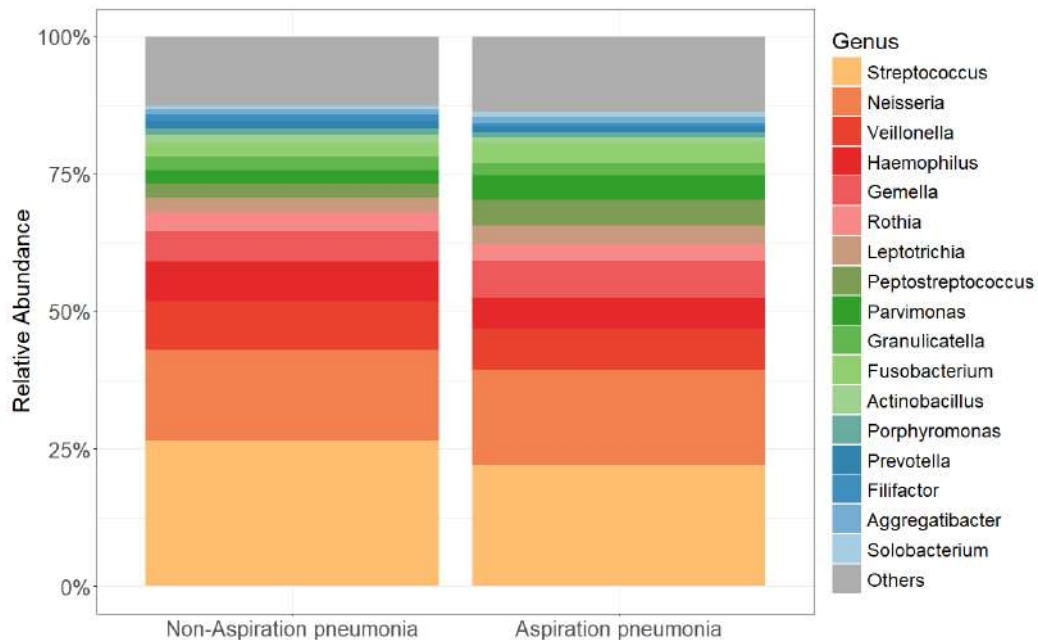


圖 (五)、有無吸入性肺炎兩組患者之菌屬層級主要組成

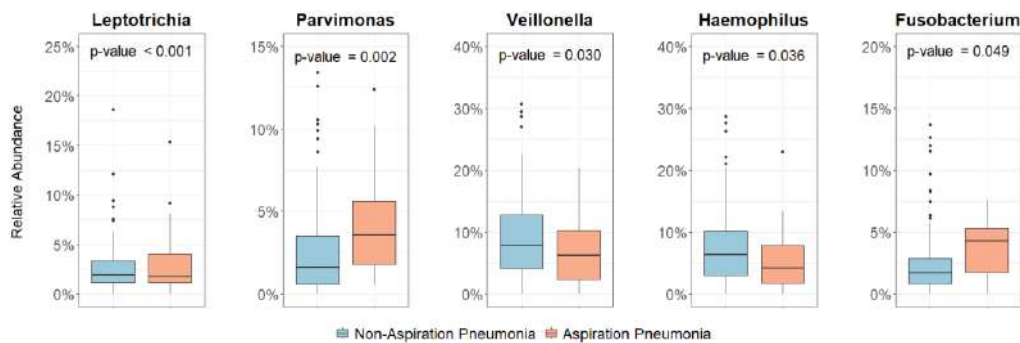


圖 (六)、有無吸入性肺炎兩組患者之菌屬層級主要組成中顯著菌屬

3.1.4 功能預測結果

在保留出現在至少 10% 樣本中的功能途徑後，針對 97 條代謝功能途徑，比較兩組患者之相對豐度差異。過去文獻顯示，較晚期的總臨床分期是吸入性肺炎的顯著風險因素[55]，因此將針對總臨床分期是否大於 3 期進行分層。針對總臨床分期小於等於 3 期的患者，有 2 條途徑具有顯著差異，且皆在無吸入性肺炎組中顯著較高，分別為 Atrazine degradation (q-value 為 0.021) 及 Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis (q-value 為 0.039)，涉及了外來物質的生物降解與代謝 (Xenobiotics biodegradation and metabolism) 及聚醣的生物合成與代謝 (Glycan biosynthesis and metabolism)，如圖 (七) 所示。針對總臨床分期大於 3 期的患者，有 4 條途徑具有顯著差異，其中僅 Alanine, aspartate and glutamate metabolism (q-value 為 0.003) 在吸入性肺炎組中顯著較高，涉及了氨基酸代謝 (Amino acid metabolism)；其餘 3 條途徑則在無吸入性肺炎組中顯著較高，分別為 Valine, leucine and isoleucine degradation (q-value 為 0.002)、GPI-anchor biosynthesis (q-value 為 0.026) 以及 Atrazine degradation (q-value 為 0.050)，涉及了氨基酸代謝 (Amino acid metabolism)、聚醣的生物合成與代謝以及外來物質的生物降解與代謝，如圖 (八) 所示。Y 軸上的功能途徑名稱以 KEGG 分級的「2 級分類代號_3 級分類」進行命名，2 級分類代號中，F 代表氨基酸代謝、H 代表聚醣的生物合成與代謝、L 代表外來物質的生物降解與代謝。

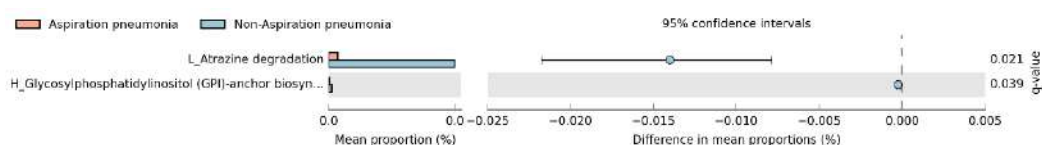
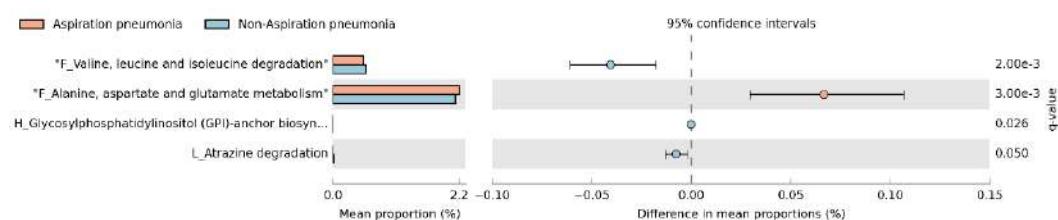


圖 (七)、有無吸入性肺炎兩組患者之功能預測 (總臨床分期 ≤ 第 3 期)

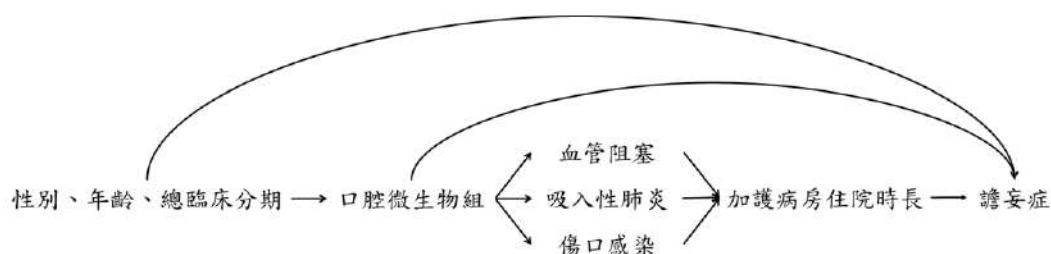


圖（八）、有無吸入性肺炎兩組患者之功能預測（總臨床分期＞第3期）

3.2 口腔微生物組與譫妄症之因果關係

3.2.1 人口統計特徵結果

圖（九）為口腔微生物組、譫妄症、干擾因子與中介因子的因果關係圖。為確保因果推論的準確性，本研究將控制性別、年齡及總臨床分期三項干擾因子，因為這些因子可能同時影響口腔微生物組的平衡與譫妄症的發生風險。先前研究表明，血管阻塞[56]、吸入性肺炎[57]及傷口感染[58]等因素可能延長 ICU 的住院時長，且 ICU 住院時長也與譫妄症相關[59]。由於本研究主要探討口腔微生物組對譫妄症的直接效應，而非透過中介因子產生的間接效應，因此需對其加以控制。後續的分析將同時控制干擾因子及中介因子，以確保結果的可靠性。進一步比較無譫妄症（N=154）與譫妄症（N=27）兩組患者之人口統計特徵，結果如表（二）所示。由於變數較多，僅列出需控制的干擾因子及中介因子。結果顯示，兩組患者在性別、年齡、總臨床分期及傷口感染上無顯著差異，在 ICU 住院時長、血管阻塞及吸入性肺炎上則呈現顯著差異，其 p-value 皆小於 0.001。



圖（九）、口腔微生物組與譫妄症之因果關係圖

表 (二)、有無譫妄症兩組患者之人口統計特徵

	無譫妄症 (N = 154)	譫妄症 (N = 27)	p-value
性別			
女性	13 (8.4%)	2 (7.4%)	1
男性	141 (91.6%)	25 (92.6%)	
年齡			
平均值 (標準差)	53.054 (9.766)	54.705 (10.740)	0.426
總臨床分期			
第 1 期至第 3 期	90 (58.4%)	12 (44.4%)	0.253
第 4 期	64 (41.6%)	15 (55.6%)	
加護病房住院時長			
≤ 7 天	138 (89.6%)	14 (51.9%)	<0.001
> 7 天	16 (10.4%)	13 (48.1%)	
血管阻塞			
否	149 (96.8%)	20 (74.1%)	<0.001
是	5 (3.2%)	7 (25.9%)	
吸入性肺炎			
否	144 (93.5%)	18 (66.7%)	<0.001
是	10 (6.5%)	9 (33.3%)	
傷口感染			
否	95 (61.7)	12 (44.4)	0.142
是	59 (38.3)	15 (55.6)	

3.2.2 Alpha 多樣性及 Beta 多樣性結果

針對兩組患者的口腔微生物組進行 alpha 多樣性分析，結果如圖(十)所示。結果顯示，譫妄症組的 alpha 多樣性皆較低，但僅在 Observed 及 Chao1 指標上具有顯著差異，p-value 皆為 0.034；在 Shannon 及 Simpson 指標上則無顯著差異，p-value 分別為 0.168 及 0.545。進一步分析兩組患者的 beta 多樣性，結果如圖(十一)所示。結果顯示，基於 Canberra 及 unweighted UniFrac 距離，兩組患者的 beta 多樣性皆具有顯著差異，p-value 分別為 0.017 及 0.013；而基於 weighted UniFrac 距離則未達顯著差異，p-value 為 0.333。PCoA 視覺化結果

顯示，基於 Canberra 距離，前兩個維度分別解釋了總變異的 2.5%及 2.1%；基於 unweighted UniFrac 距離，分別解釋了總變異的 7%及 4.1%；基於 weighted UniFrac 距離，則分別解釋了總變異的 14.9%及 9.9%。

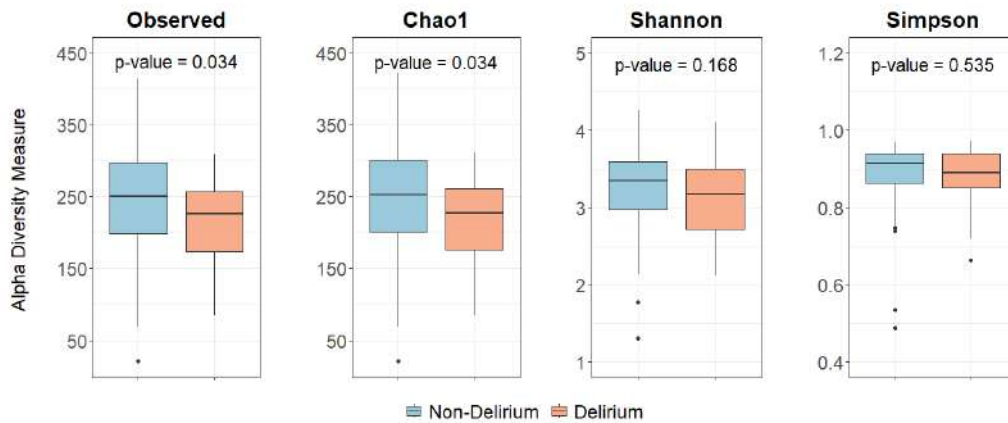


圖 (十)、有無譫妄症兩組患者之 alpha 多樣性指標

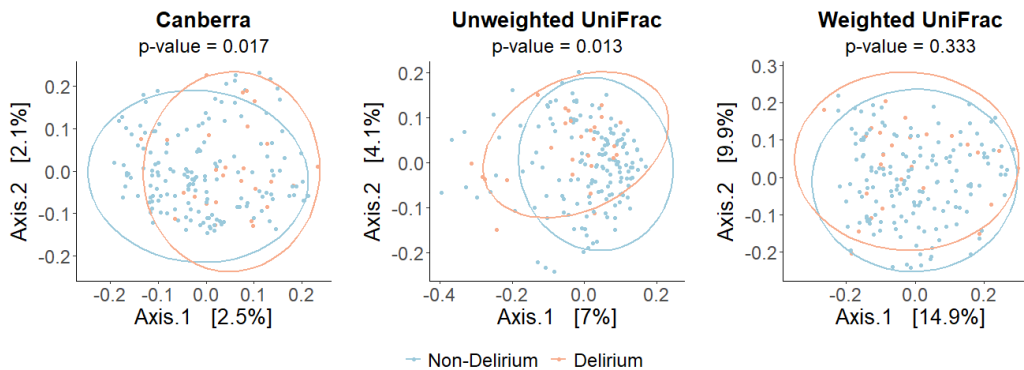


圖 (十一)、有無譫妄症兩組患者之 beta 多樣性指標

3.2.3 豐度差異分析結果

保留出現在至少 10%樣本中的菌屬後，針對 105 個菌屬，比較兩組患者之相對豐度差異，結果如圖 (十二) 所示。結果顯示，有 11 個菌屬具有顯著差異，其中 7 個菌屬在譫妄症組中顯著較高，分別為 *Haemophilus* (p-value 為 <0.001)、*Kingella* (p-value 為 0.005)、*Neisseria* (p-value 為 0.007)、*Brachymonas* (p-value

為 0.015)、*Eikenella* (p-value 為 0.026)、*Halomonas* (p-value 為 0.033) 以及 *Actinomyces* (p-value 為 0.044)；其餘 4 個菌屬則在無譫妄症組中顯著較高，分別為 *Bacteroides* (p-value 為 <0.001)、*Parascardovia* (p-value 為 0.001)、*Bergeyella* (p-value 為 0.015) 及 *Dialister* (p-value 為 0.027)。

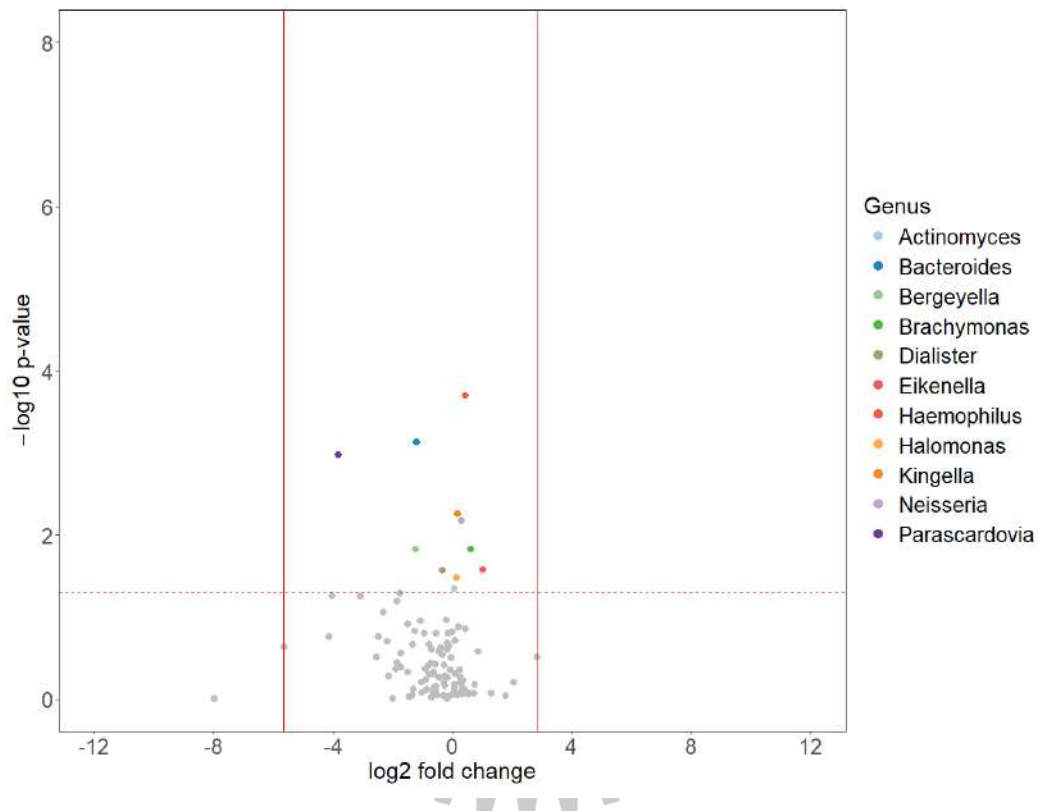


圖 (十二)、有無譫妄症兩組患者之菌屬層級相對豐度差異

在菌屬層級的主要組成中，有 15 個菌屬在至少任一組中所佔比例超過 1%，這些菌屬約佔所有微生物組的 85.5%，如圖 (十三) 所示。以譫妄症組為例，主要菌屬為 *Streptococcus* (23.58%) 與 *Neisseria* (19.81%)，其次依序為 *Haemophilus* (9.01%)、*Veillonella* (8.09%)、*Gemella* (5.07%)、*Rothia* (3.42%)、*Peptostreptococcus* (3.04%)、*Fusobacterium* (2.82%)、*Leptotrichia* (2.80%)、*Parvimonas* (2.78%)、*Granulicatella* (2.24%)、*Actinobacillus* (1.55%)、

Porphyromonas (1.43%) 及 *Prevotella* (1.10%)。在主要組成中，有 2 個菌屬具有顯著差異，且皆在譫妄症組中顯著較高，分別為 *Haemophilus* (p-value 為 <0.001) 與 *Neisseria* (p-value 為 0.007)，如圖 (十四) 為所示。

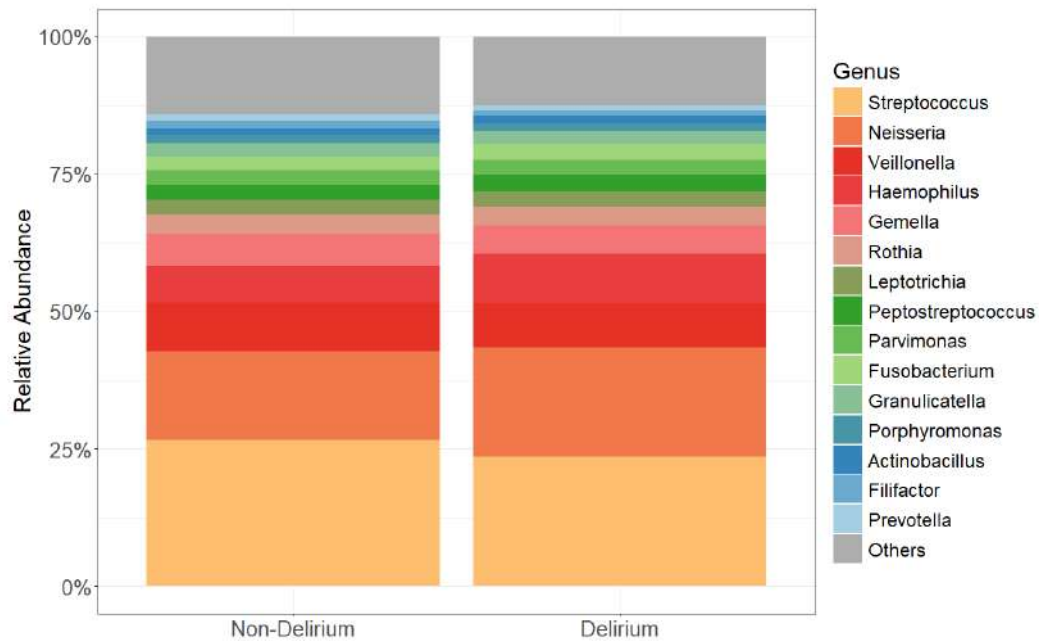


圖 (十三)、有無譫妄症兩組患者之菌屬層級主要組成

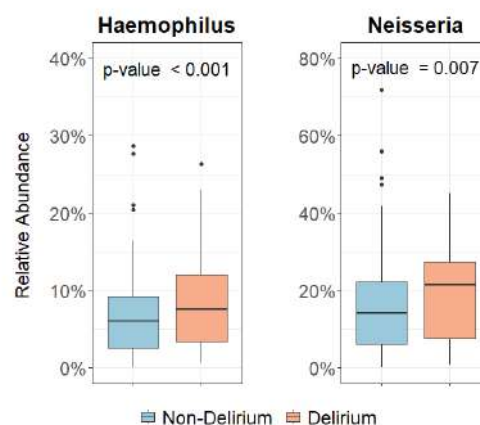


圖 (十四)、有無譫妄症兩組患者之菌屬層級主要組成中顯著菌屬

3.2.4 功能預測結果

在保留出現在至少 10% 樣本中的功能途徑後，針對 97 條代謝功能途徑，比較兩組患者之相對豐度差異。由於過去文獻顯示，患者容易因為 ICU 住院時間過長，導致譫妄症的發病率增加[60]，因此將針對 ICU 住院時長是否大於 7 天進行分層分析。針對 ICU 住院時長小於等於 7 天的患者，有 3 條途徑具有顯著差異，且皆在無譫妄症組中顯著較高，分別為 Ethylbenzene degradation (q-value 為 0.006)、Chloroalkane and chloroalkene degradation (q-value 為 0.012) 及 beta-Alanine metabolism (q-value 為 0.045)，涉及外來物質的生物降解與代謝及其他氨基酸代謝 (Metabolism of other amino acids)，如圖 (十五) 所示。針對 ICU 住院時長大於 7 天的患者，有 5 條途徑具有顯著差異，其中 4 條途徑在譫妄症組中顯著較高，分別為 Glycerophospholipid metabolism (q-value 為 0.013)、Nitrogen metabolism (q-value 為 0.013)、Glycine, serine and threonine metabolism (q-value 為 0.019) 及 Fatty acid degradation (q-value 為 0.049)，涉及能量代謝 (Energy metabolism)、脂質代謝 (Lipid metabolism) 及氨基酸代謝；而 Chloroalkane and chloroalkene degradation 則在無譫妄症組中顯著較高，q-value 為 0.044，涉及外來物質的生物降解與代謝，如圖 (十六) 所示。2 級分類代號中，C 代表能量代謝、D 代表脂質代謝、F 代表氨基酸代謝、L 代表外來物質的生物降解與代謝、G 代表其他氨基酸代謝。

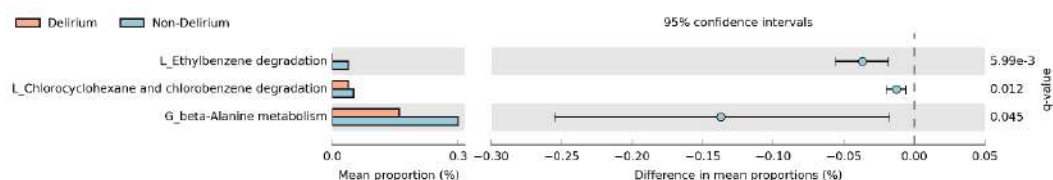
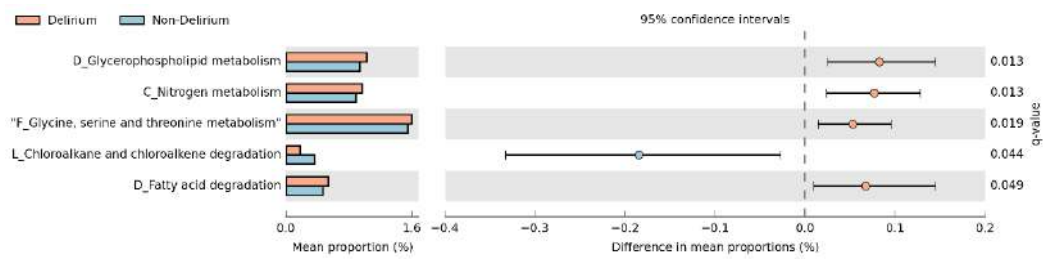


圖 (十五)、有無譫妄症兩組患者之功能預測 (ICU 住院時長 ≤ 7 天)



圖（十六）、有無譫妄症兩組患者之功能預測（ICU 住院時長>7 天）



第四章、討論

4.1 口腔微生物組與吸入性肺炎之因果關係

吸入性肺炎可能影響患者的 ICU 入院率與再入院率[7]，甚至可能提高其死亡率[8]。因此，釐清口腔微生物組對吸入性肺炎的影響，將有助於提高早期識別的準確性，並發展更有效的預防與治療策略。雖然過去已有多項研究探討口腔及舌苔微生物與肺炎之間的關聯，但針對吸入性肺炎的研究仍相對較少，且過去多數研究皆著重於口腔衛生問題。本研究為首例探討口腔微生物組與吸入性肺炎之間的關聯性，並進一步分析其可能的因果關係。

4.1.1 口腔微生物組之結果探討

Alpha 多樣性分析結果顯示，吸入性肺炎組在 Observed 及 Chao1 指標上顯著較低，表示較低的物種豐富度可能會增加吸入性肺炎風險。在 beta 多樣性方面，基於 Canberra 及 unweighted UniFrac 距離，兩組患者的微生物組成亦存在顯著差異，表示口腔微生物組的結構差異可能影響吸入性肺炎的發生。過去一項針對成人急性呼吸衰竭患者的研究，分析了接受機械通氣的 ICU 患者與健康對照組之間的微生物組差異。該研究將 ICU 患者進一步分為宏觀吸入性肺炎（macro-aspiration pneumonia）、非宏觀吸入性肺炎（non-macro-aspiration pneumonia）與接受機械通氣以保護呼吸道但無感染證據的患者（intubated control）。該研究結果顯示，無論是上呼吸道（upper respiratory tract, URT）或下呼吸道（lower respiratory tract, LRT）微生物組分析，宏觀吸入性肺炎組的 alpha 多樣性皆顯著低於健康對照組。此外，beta 多樣性分析結果顯示，四組患者間的 URT 及 LRT 微生物組成存在顯著差異[61]。儘管該文獻的研究方法與本研究存在些許差異，但其結果進一步支持口腔微生物組可能影響吸入性肺炎發生風險的假設。

此外，本研究結果顯示 *Veillonella* 與吸入性肺炎呈負相關。而過去研究指出，若患者舌苔微生物中 *Prevotella*、*Veillonella* 和 *Treponema* 等菌屬豐度較高，則有顯著較高的肺炎風險[24]，此結果與本研究並不一致。一項研究認為，*Veillonella* 並非肺炎的主要致病菌，可能在其發病過程中扮演調節者的角色 [62]。作為早期定植菌及橋樑菌屬，*Veillonella* 在口腔微生物群落的發展中發揮關鍵作用，能與其他微生物建立共生關係，被認為對維持微生物群落的平衡十分重要。

4.1.2 功能預測之結果探討

根據總臨床分期分層分析結果，Atrazine degradation 及 GPI-anchor biosynthesis 仍具有顯著差異，且與吸入性肺炎呈負相關。草脫淨 (atrazine) 是一種具有潛在毒性的除草劑，被多項研究證實對免疫功能有不良影響[63]。雖然本研究患者可能未直接接觸草脫淨，但其降解途徑可能在體內作為解毒機制，進而增強免疫功能。這或許可以解釋為何該途徑在無吸入性肺炎組中較活躍，因為解毒作用與免疫增強可能降低對感染的易感性。未來研究可進一步探討此類途徑是否能透過微生物代謝機制間接調節免疫健康。GPI 錨定 (GPI anchor) 參與蛋白質附著於細胞膜的過程，並在訊號傳導 (signal transduction)、細胞黏附 (cell adhesion) 及與細胞外環境互動中發揮作用。其功能對維持細胞穩定十分重要，並可能影響免疫反應[64]。該生物合成途徑失調可能會影響宿主免疫功能，進而間接增加對肺炎等感染性疾病的易感性，這或許也可以解釋為何該途徑在無吸入性肺炎組中更為活躍。

4.2 口腔微生物組與譫妄症之因果關係

針對 OSCC 術後患者，譫妄症的發生可能導致康復延緩[12]、認知功能衰退、併發症風險[10, 11]及醫療成本的上升[9]。因此，釐清其發生機制對於識別高風險患者並改善臨床治療策略相當重要。由於，先前研究多關注於口腔健康與譫妄

症的關係，亦或是從腸道微生物的角度切入，針對口腔微生物組與譫妄症之間的關係仍缺乏系統性研究。本研究是首次對此議題進行分析，並結合因果推論方法，控制可能的干擾因子與中介因子，確保研究結果能更準確地反映口腔微生物組對譫妄症的影響，為未來臨床應用與干預策略提供新方向。

4.2.1 口腔微生物組之結果探討

Alpha 多樣性分析結果顯示，在 Observed 及 Chao1 指標上，譫妄症組的多樣性顯著較低，表示較低的物種豐富度可能會導致譫妄症風險的增加，但在 Shannon 及 Simpson 指標上則未達統計顯著。這可能與樣本中 ASV 間的豐度分布不均有關，即某些 ASV 在樣本中占據較高的豐度，而其他 ASV 則相對稀疏，導致群落組成的不均勻性，影響 alpha 多樣性指標的計算結果。此外，beta 多樣性分析結果表明，基於 Canberra 及 unweighted UniFrac 距離，兩組患者的微生物組成存在顯著差異，表示口腔微生物的組成可能影響譫妄症的發生風險。一項關於腸道微生物與譫妄症的研究，針對 113 名 65 歲及以上的急診患者，研究發現腸道微生物 alpha 多樣性較低與較高的譫妄症風險有關，beta 多樣性分析亦顯示組間存在顯著差異[65]。其結果與本研究的發現一致。雖然該研究與口腔微生物無直接關聯，但仍間接支持口腔微生物組可能影響譫妄症發生風險的假設，呼應了微生物組與中樞神經系統功能變化之間的潛在關聯。

神經炎症（neuroinflammation）是譫妄症的重要風險因子，特別是在重大頭頸部手術後[66, 67]。術後常見的全身性炎症反應綜合症（systemic inflammatory response syndrome）可能破壞血腦屏障（blood-brain barrier），使炎症因子進入大腦，進而誘發炎症反應並增加譫妄症風險[68]。本研究發現多種可能引發感染或促進神經炎症的菌屬，包括 *Haemophilus*、*Kingella*、*Neisseria*、*Brachymonas*、*Eikenella*、*Halomonas* 及 *Actinomyces*[67, 69, 70]。其中，*Haemophilus* 被認為是一種與炎症相關的機會性病原體（opportunistic pathogen），屬於 HACEK 細菌群

(*Haemophilus*、*Aggregatibacter*、*Cardiobacterium*、*Eikenella* 與 *Kingella*)，可在 1.4%至 3%的心內膜炎 (infective endocarditis) 病例中檢測到[71]。*Neisseria* 則與肝硬化患者的肺炎相關，其分泌的外膜囊泡 (outer membrane vesicles) 可透過融合或附著與周圍細胞互動[72]。這些機制可能提升細菌的適應性，進而破壞口咽部微生物組[73, 74]。這類菌群失衡可能削弱粘膜生物膜 (mucosal biofilm) 的保護功能，促進機會性病原體的增殖，進一步加劇全身性炎症反應。這些結果強調了口腔微生物組變化如何影響全身性炎症及增加譫妄症風險。因次，控制炎症與維持微生物平衡可能是降低 OSCC 術後譫妄症風險的重要策略。

4.2.2 功能預測之結果探討

功能預測分析結果顯示，譫妄症組的 Glycerophospholipid metabolism 顯著較高。脂質對於神經元的結構、功能與生理極為重要，參與神經傳導 (neurotransmission)、神經元新生 (neurogenesis)、突觸傳遞 (synaptic transmission)、訊號傳導、細胞膜組成 (membrane organization) 及基因表達調控 (gene expression regulation) 等過程[75-77]。先前研究指出，甘油磷脂代謝失調可能導致促炎介質的增加[78, 79]，進一步加劇神經炎症，這已被證實為譫妄症的重要誘發因素。本研究結果亦進一步支持代謝變化在譫妄症發生機制中的關鍵角色。此外，與譫妄症風險相關的代謝途徑還包括 Glycine metabolism 及 Chloroalkane and chloroalkene degradation。其中，Glycine metabolism 在譫妄症組中顯著較高。甘氨酸 (glycine) 作為抑制性神經遞質 (inhibitory neurotransmitter)，並參與肌酸 (creatine) 及穀胱甘肽 (glutathione) 等生物分子的合成，其調控異常可能導致神經功能受損。甘氨酸不足可能削弱神經抑制功能，增加神經迴路的興奮性，而引發與譫妄症相關的認知功能障礙[80, 81]。而經 ICU 住院時長分層分析後，Chloroalkane and chloroalkene degradation 仍在無譫妄症組中顯著較高。由於某些氯代烷 (chloroalkanes) 與氯代烯 (chloroalkenes) 已被證實為神經毒素

(neurotoxins)，可能引起急性認知變化[82]。因此，無譫妄症組中該降解途徑的高豐度可能有助於降低神經毒素的影響，發揮潛在的保護作用。這些結果表明其代謝途徑可能透過調控神經興奮 (neuronal excitability) 與清除神經毒性 (neurotoxic clearance) 來影響譫妄症風險。

4.3 研究限制

儘管本研究已盡力滿足因果推論與微生物分析的要求，但仍存在一些限制。首先，因果推論需控制所有已知的干擾因子。雖然本研究已盡可能對此進行控制，但數據中並未包含飲食習慣或口腔衛生等相關變數，而這些因素可能對微生物組成造成影響。此外，由於數據中僅記錄患者於 ICU 住院期間是否發生譫妄症及吸入性肺炎，未提供發作頻率或持續時間等詳細資訊，因此無法進一步探討口腔微生物組成是否與症狀嚴重程度相關。最後，由於 White 非參數 t 檢定無法同時校正多個干擾因子，因此本研究僅能針對影響譫妄症或吸入性肺炎最大的變數進行分層分析，可能會影響部分功能預測結果的準確性與解釋性。

4.4 未來展望

本研究為首項探討 OSCC 患者術前口腔微生物組與術後譫妄症及吸入性肺炎之間關聯性的研究，並初步建立了因果關係，為未來相關研究提供基礎。未來可進一步探討口腔微生物組如何透過中介效應影響譫妄症的發展，以釐清微生物在術後併發症發生機制中的角色。研究結果顯示，口腔微生物組可能透過調節免疫反應、影響解毒機制，以及維持微生物群落平衡，來影響吸入性肺炎的發生風險。此外，特定菌群的變化亦可能促進神經炎症或影響感染途徑，進而增加譫妄症的風險。本研究強調了口腔微生物組在 OSCC 術後併發症中的潛在影響，未來若能透過調控微生物組成來改善免疫調節與炎症反應，或許可作為降低譫妄症與吸入性肺炎風險的臨床干預策略，改善患者的術後預後與生活品質。

參考資料

1. Giovannacci, I., et al., *Non-invasive visual tools for diagnosis of oral cancer and dysplasia: A systematic review*. Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal, 2016. **21**(3): p. e305.
2. Feller, L. and J. Lemmer, *Oral squamous cell carcinoma: epidemiology, clinical presentation and treatment*. Journal of cancer therapy, 2012. **3**(4): p. 263-268.
3. Rivera, C., *Essentials of oral cancer*. International journal of clinical and experimental pathology, 2015. **8**(9): p. 11884.
4. Chen, Y., et al., *Primary oral squamous cell carcinoma: an analysis of 703 cases in southern Taiwan*. Oral oncology, 1999. **35**(2): p. 173-179.
5. Stephenson, C., et al. *Management of common postoperative complications*. in *Mayo Clinic Proceedings*. 2020. Elsevier.
6. Yeung, J.K., et al., *Delayed mobilization after microsurgical reconstruction: an independent risk factor for pneumonia*. The Laryngoscope, 2013. **123**(12): p. 2996-3000.
7. Sabaté, S., V. Mazo, and J. Canet, *Predicting postoperative pulmonary complications: implications for outcomes and costs*. Current Opinion in Anesthesiology, 2014. **27**(2): p. 201-209.
8. Petrar, S., et al., *Pulmonary complications after major head and neck surgery: a retrospective cohort study*. The Laryngoscope, 2012. **122**(5): p. 1057-1061.
9. Gou, R.Y., et al., *One-year medicare costs associated with delirium in older patients undergoing major elective surgery*. JAMA surgery, 2021. **156**(5): p. 462-470.
10. Girard, T.D., et al., *Delirium as a predictor of long-term cognitive impairment in survivors of critical illness*. Critical care medicine, 2010. **38**(7): p. 1513-1520.
11. Pandharipande, P.P., et al., *Long-term cognitive impairment after critical illness*. New England Journal of Medicine, 2013. **369**(14): p. 1306-1316.
12. Ely, E.W., et al., *Delirium as a predictor of mortality in mechanically ventilated patients in the intensive care unit*. Jama, 2004. **291**(14): p. 1753-1762.
13. Robinson, T.N., et al., *Postoperative delirium in the elderly: risk factors and outcomes*. Annals of surgery, 2009. **249**(1): p. 173-178.
14. Cho, I. and M.J. Blaser, *The human microbiome: at the interface of health and disease*. Nature Reviews Genetics, 2012. **13**(4): p. 260-270.
15. Castellarin, M., et al., *Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma*. Genome research, 2012. **22**(2): p. 299-306.
16. Kostic, A.D., et al., *Genomic analysis identifies association of Fusobacterium*

- with colorectal carcinoma. *Genome research*, 2012. **22**(2): p. 292-298.
17. Reikvam, D.H., et al., *Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression*. *PloS one*, 2011. **6**(3): p. e17996.
 18. Hill-Burns, E.M., et al., *Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome*. *Movement disorders*, 2017. **32**(5): p. 739-749.
 19. Fu, S.-C., et al., *Exploring the causal effect of constipation on Parkinson's disease through mediation analysis of microbial data*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022. **12**: p. 871710.
 20. Vogt, N.M., et al., *Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease*. *Scientific reports*, 2017. **7**(1): p. 13537.
 21. Deo, P.N. and R. Deshmukh, *Oral microbiome: Unveiling the fundamentals*. *Journal of oral and maxillofacial pathology*, 2019. **23**(1): p. 122-128.
 22. Dewhirst, F.E., et al., *The human oral microbiome*. *Journal of bacteriology*, 2010. **192**(19): p. 5002-5017.
 23. Sharma, N., et al., *Oral microbiome and health*. *AIMS microbiology*, 2018. **4**(1): p. 42.
 24. Takeshita, T., 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**(6): p. 1050-7.
 25. Kageyama, S., et al., *Relationships of Variations in the Tongue Microbiota and Pneumonia Mortality in Nursing Home Residents*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2018. **73**(8): p. 1097-1102.
 26. Pathak, J.L., et al., *The role of oral microbiome in respiratory health and diseases*. *Respir Med*, 2021. **185**: p. 106475.
 27. Sumi, Y., et al., *Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in dependent elderly*. *Archives of gerontology and geriatrics*, 2007. **44**(2): p. 119-124.
 28. Terpenning, M.S., et al., *Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population*. *Journal of the American Geriatrics Society*, 2001. **49**(5): p. 557-563.
 29. Palmer, L.B., et al., *Oral Clearance and Pathogenic Oropharyngeal Colonization in the Elderly*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. **164**: p. 464-8.
 30. Teramoto, S., et al., *High incidence of aspiration pneumonia in community- and hospital-acquired pneumonia in hospitalized patients: a multicenter, prospective study in Japan*. *J Am Geriatr Soc*, 2008. **56**(3): p. 577-9.
 31. Oda, K., *Oral health vital for hospitalised elderly*. *Kai Tiaki Nursing New*

- Zealand, 2017. **23**(10): p. 14-6.
32. Nakatani, S., et al., *Prevalence of pre-operative undiagnosed cognitive impairment and its association with handgrip strength, oral hygiene, and nutritional status in older elective surgical patients in Japan*. J Anesth, 2023. **37**(1): p. 64-71.
 33. Fang, W.-l., et al., *Tooth loss as a risk factor for dementia: systematic review and meta-analysis of 21 observational studies*. BMC psychiatry, 2018. **18**: p. 1-11.
 34. Onozuka, M., et al., *Age-related changes in brain regional activity during chewing: a functional magnetic resonance imaging study*. Journal of Dental Research, 2003. **82**(8): p. 657-660.
 35. Zhang, Y., et al., *The association between gut microbiota and postoperative delirium in patients*. Translational Psychiatry, 2023. **13**(1): p. 156.
 36. Yang, C.-Y., et al., *Oral microbiota community dynamics associated with oral squamous cell carcinoma staging*. Frontiers in microbiology, 2018. **9**: p. 862.
 37. Martin, M., *Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads*. EMBnet. journal, 2011. **17**(1): p. 10-12.
 38. Rognes, T., et al., *VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics*. PeerJ, 2016. **4**: p. e2584.
 39. Amir, A., et al., *Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns*. MSystems, 2017. **2**(2): p. 10.1128/msystems.00191-16.
 40. Douglas, G.M., et al., *PICRUSt2 for prediction of metagenome functions*. Nature biotechnology, 2020. **38**(6): p. 685-688.
 41. Chao, A., *Nonparametric estimation of the number of classes in a population*. Scandinavian Journal of statistics, 1984: p. 265-270.
 42. Shannon, C.E., *A mathematical theory of communication*. The Bell system technical journal, 1948. **27**(3): p. 379-423.
 43. Simpson, E., *Measurement of Diversity*. Nature, 1949. **163**.
 44. Anderson, M.J., *Permutational multivariate analysis of variance*. Department of Statistics, University of Auckland, Auckland, 2005. **26**: p. 32-46.
 45. Gower, J.C., *Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis*. Biometrika, 1966. **53**(3-4): p. 325-338.
 46. Lance, G.N. and W.T. Williams, *Mixed-Data Classificatory Programs I - Agglomerative Systems*. Aust. Comput. J., 1967. **1**: p. 15-20.
 47. Lozupone, C. and R. Knight, *UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities*. Applied and environmental microbiology, 2005. **71**(12): p. 8228-8235.

48. Lozupone, C.A., et al., *Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities*. Applied and environmental microbiology, 2007. **73**(5): p. 1576-1585.
49. Lin, H. and S.D. Peddada, *Analysis of microbial compositions: a review of normalization and differential abundance analysis*. NPJ biofilms and microbiomes, 2020. **6**(1): p. 60.
50. Greene, W.H., *Accounting for excess zeros and sample selection in Poisson and negative binomial regression models*. 1994.
51. Xia, F., et al., *A logistic normal multinomial regression model for microbiome compositional data analysis*. Biometrics, 2013. **69**(4): p. 1053-63.
52. White, J.R., N. Nagarajan, and M. Pop, *Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples*. PLoS computational biology, 2009. **5**(4): p. e1000352.
53. Storey, J.D. and R. Tibshirani, *Statistical significance for genomewide studies*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(16): p. 9440-9445.
54. Parks, D.H., et al., *STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles*. Bioinformatics, 2014. **30**(21): p. 3123-3124.
55. Mortensen, H.R., K. Jensen, and C. Grau, *Aspiration pneumonia in patients treated with radiotherapy for head and neck cancer*. Acta Oncologica, 2013. **52**(2): p. 270-276.
56. Ryan, M.W. and M. Hochman, *Length of stay after free flap reconstruction of the head and neck*. The Laryngoscope, 2000. **110**(2): p. 210-210.
57. Rosenthal, V.D., et al., *The attributable cost and length of hospital stay because of nosocomial pneumonia in intensive care units in 3 hospitals in Argentina: a prospective, matched analysis*. American journal of infection control, 2005. **33**(3): p. 157-161.
58. Chen, Y.-Y., Y.-C. Chou, and P. Chou, *Impact of nosocomial infection on cost of illness and length of stay in intensive care units*. Infection Control & Hospital Epidemiology, 2005. **26**(3): p. 281-287.
59. Kirfel, A., et al., *Postoperative delirium is an independent factor influencing the length of stay of elderly patients in the intensive care unit and in hospital*. Journal of Anesthesia, 2022. **36**(3): p. 341-348.
60. Ely, E., et al., *The impact of delirium in the intensive care unit on hospital length of stay*. Intensive care medicine, 2001. **27**: p. 1892-1900.
61. Kitsios, G.D., et al., *The upper and lower respiratory tract microbiome in severe aspiration pneumonia*. Iscience, 2023. **26**(6).
62. Zhou, P., et al., *Veillonellae: beyond bridging species in oral biofilm ecology*.

- Frontiers in Oral Health, 2021. **2**: p. 774115.
63. Holásková, I., et al., *Long-term immunotoxic effects of oral prenatal and neonatal atrazine exposure*. Toxicological Sciences, 2019. **168**(2): p. 497-507.
 64. Lebreton, S., C. Zurzolo, and S. Paladino, *Organization of GPI-anchored proteins at the cell surface and its physiopathological relevance*. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 2018. **53**(4): p. 403-419.
 65. Garcez, F.B., et al., *Association between gut microbiota and delirium in acutely ill older adults*. The Journals of Gerontology: Series A, 2023. **78**(8): p. 1320-1327.
 66. Xiao, M., et al., *Postoperative delirium, neuroinflammation, and influencing factors of postoperative delirium: a review*. Medicine, 2023. **102**(8): p. e32991.
 67. Yang, I., et al., *The oral microbiome and inflammation in mild cognitive impairment*. Experimental Gerontology, 2021. **147**: p. 111273.
 68. Barichello, T., et al., *The blood-brain barrier dysfunction in sepsis*. Tissue barriers, 2021. **9**(1): p. 1840912.
 69. Farmen, K., M. Tofiño-Vian, and F. Iovino, *Neuronal damage and neuroinflammation, a bridge between bacterial meningitis and neurodegenerative diseases*. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2021. **15**: p. 680858.
 70. Lu, H., et al., *Alterations of Bacteroides sp., Neisseria sp., Actinomyces sp., and Streptococcus sp. populations in the oropharyngeal microbiome are associated with liver cirrhosis and pneumonia*. BMC infectious diseases, 2015. **15**: p. 1-11.
 71. Chambers, S.T., et al., *HACEK infective endocarditis: characteristics and outcomes from a large, multi-national cohort*. PloS one, 2013. **8**(5): p. e63181.
 72. Corander, J., et al., *Population structure in the Neisseria, and the biological significance of fuzzy species*. Journal of The Royal Society Interface, 2012. **9**(71): p. 1208-1215.
 73. Schertzer, J.W. and M. Whiteley, *Bacterial outer membrane vesicles in trafficking, communication and the host-pathogen interaction*. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 2013. **23**(1-2): p. 118-130.
 74. Kuehn, M.J. and N.C. Kesty, *Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction*. Genes & development, 2005. **19**(22): p. 2645-2655.
 75. Cermenati, G., et al., *Lipids in the nervous system: from biochemistry and molecular biology to patho-physiology*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2015. **1851**(1): p. 51-60.
 76. Korevaar, J.C., B.C. van Munster, and S.E. de Rooij, *Risk factors for delirium in acutely admitted elderly patients: a prospective cohort study*. BMC geriatrics,

2005. **5**: p. 1-8.
77. Maldonado, J.R., *Delirium pathophysiology: an updated hypothesis of the etiology of acute brain failure*. International journal of geriatric psychiatry, 2018. **33**(11): p. 1428-1457.
78. Frisardi, V., et al., *Glycerophospholipids and glycerophospholipid-derived lipid mediators: a complex meshwork in Alzheimer's disease pathology*. Progress in lipid research, 2011. **50**(4): p. 313-330.
79. Mendes-Frias, A., et al., *Dysregulation of glycerophospholipid metabolism during Behçet's disease contributes to a pro-inflammatory phenotype of circulating monocytes*. Journal of Translational Autoimmunity, 2020. **3**: p. 100056.
80. López-Corcuera, B., A. Geerlings, and C. Aragón, *Glycine neurotransmitter transporters: an update*. Molecular membrane biology, 2001. **18**(1): p. 13-20.
81. Carmans, S., et al., *The inhibitory neurotransmitter glycine modulates macrophage activity by activation of neutral amino acid transporters*. Journal of neuroscience research, 2010. **88**(11): p. 2420-2430.
82. Popoff, M.R. and B. Poulain, *Bacterial toxins and the nervous system: neurotoxins and multipotential toxins interacting with neuronal cells*. Toxins, 2010. **2**(4): p. 683-737.

