

令和元年6月5日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11861

研究課題名(和文) 口腔の健康に寄与する口腔細菌叢の機能解明を目指した未同定主要細菌の分離同定

研究課題名(英文) Identification of unnamed bacteria species in saliva to elucidate the relationship between oral microbiome and oral health conditions

研究代表者

柴田 幸江 (Shibata, Yukie)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：30274476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：口腔健康者の口腔細菌叢を解析した結果、優勢な細菌種は13属24種で構成されていた。24菌種中、菌種名が確定していないものが9菌種存在し、その中の6菌種がStreptococcus属であり、平均の合計で約17%であった。未確定菌種をその構成率の高い被験者から分離同定した結果、16S rRNA遺伝子の塩基配列が*S. mitis*ならびに未確定の2菌種に99.5%以上の相同性を示した分離株が認められた。分離株の生化学的性状については口腔環境に適応したことによる変化も認められたが、*S. mitis*標準株に類似しており、これらの2菌種は*S. mitis*に極めて近縁の菌種である可能性が高いと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究室では口腔細菌叢のバランスと口腔疾患との関係について研究を進めており、口腔が健康な人々に特徴的な口腔細菌叢が存在することを認め、主要な細菌構成を明らかにした。しかしながら、これらの細菌種の中には、菌属名のみで菌種名が確定していない細菌種が多く存在し、細菌叢としてどのような機能を有して口腔の健康に寄与しているのかまだ十分に解明されていない。本研究で未確定な2菌種を口腔内より分離同定し、生化学的性状を明らかにしたことにより、口腔の健康に対する細菌叢の機能解明に一步近づいたと考えられる。また、分離株と標準株の生化学的性状の差異は口腔内での細菌種間の相互作用を考える上で重要な情報である。

研究成果の概要(英文)：The bacterial components of the salivary microbiota of orally healthy subjects were determined by barcoded pyrosequencing analysis of the 16S rRNA gene and 24 species from 13 genera were defined as predominant bacteria. Of them, 9 species including 6 *Streptococcus* species (*Streptococcus* sp.) were unnamed. The mean relative abundance of 6 *Streptococcus* sp. was about 17% in total. To elucidate the characteristic of unnamed *Streptococcus* sp., we tried to isolate them from human saliva. Several isolates showed the similarity of more than 99.5% to *S. mitis* and two species among unnamed *Streptococcus* sp. They had similar biochemical properties to *S. mitis* except a few enzyme activities. The results suggested that these 2 unnamed *Streptococcus* sp might be closely related to *S. mitis*.

研究分野：予防歯科

キーワード：口腔細菌叢 口腔の健康 Streptococcus属

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、腸内細菌の研究において腸内細菌叢のバランスが注目され、バランスのとれた腸内細菌叢が腸管の免疫系を適切に活性化することでヒトの健康が維持されていることが分かり、腸内細菌のバランスと免疫系との関係が詳しく調べられている。口腔内にも腸内と同様に、多くの(700種を超えるといわれている)細菌種が存在しており、病原細菌に関する研究とともに、口腔細菌叢のバランスと口腔疾患との関係についての研究が進められてきた。

我々の研究室では口腔が健康な人々に特徴的な口腔細菌叢が存在することを見だし、口腔細菌叢のバランスの変化を察知するためには、その細菌構成を明らかにする必要があると考えた。そこで、久山コホート研究の対象者から口腔健常者 166 名を選んで唾液を採取し、次世代シーケンサーを用いて唾液細菌叢の解析を行い、全体で 529 の細菌種を検出した。構成比率と分布率から 41 細菌種が優勢あるいは広汎に存在する主要な細菌種とわかり、健康な口腔細菌叢の全体像(どのような細菌種によって、どのような構成比率で構築されているのか)が見えてきた。次に目指すのは健康な細菌叢とはどのような機能を有して口腔の健康に寄与しているのかを解明することである。しかしながら、主要な細菌種の中には、菌属名のみで菌種名が確定していない細菌種が 11 種存在し、特に、41 菌種のなかで最も高い構成比率(平均構成比率約 20%)を占め、他の細菌種に比べて研究が非常に進んでいる *Streptococcus* 属細菌種(13 種)の中にも菌種名が確定していない菌種が 5 種類も存在した。

2. 研究の目的

口腔の健康に寄与する口腔細菌叢に着目し、それを構成している主要な細菌種のなかで菌種名が確定していない細菌種を分離同定する。まずは *Streptococcus* 属細菌種をターゲットとする。次に、分離同定された細菌種の特徴を近縁の標準株と比較検討する。さらに、細菌叢のネットワーク解析を行い、ネットワークを形成している個々の細菌の性状ならびに共培養時の細菌間の相互作用を検討して、健康な口腔細菌叢の機能解明を目指す。

3. 研究の方法

1) 口腔健常者の唾液の採取

本来ならば、すでに口腔細菌叢の解析が終了している久山研究の対象者の中から、目的とする細菌種の分布率の高い人を選んで釣菌することが最適である。しかしながら、久山研究の対象者から釣菌のためだけに唾液を再び採取することは困難であるため、本研究では釣菌のためを対象者を九州大学歯学部学生ならびに口腔予防医学分野医局員とする。分離同定を目指している細菌種は健康な口腔を有する人に優勢・広汎に存在するものであるため、被験者の年齢が変わっても、コアとなる細菌種の釣菌は可能と考えられる。

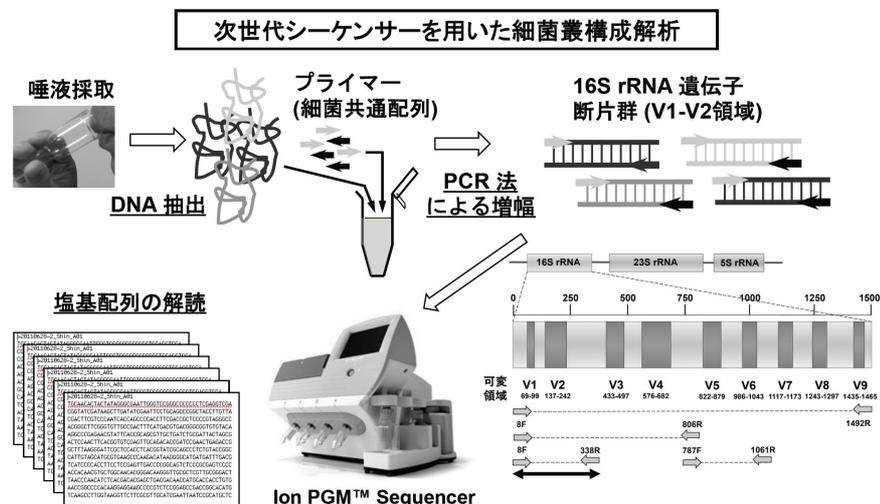
現在歯数が 24 歯以上で歯周ポケット深さ (PD) が 4 mm 未満の学生に対して本研究内容を説明し、同意が得られた者 60 名を被験者とする。加えて医局員 12 名の唾液を解析し、釣菌対象者とする。

唾液採取は 5 分間のパラフィン咀嚼時の刺激唾液を採取する。

2) 次世代シーケンサーによる唾液の細菌叢解析

目的の細菌種の釣菌を最も効果的に行うため、被験者の唾液の細菌構成を解析し、釣菌しようとする細菌種の構成比率が高い被験者を細菌種毎に選別する。下図に示すように、ビーズ破砕法を用いて唾液から抽出した細菌 DNA をテンプレートとして 16S rRNA 遺伝子の V1-V2 領域を PCR で増幅し、増幅したアンプリコンの塩基配列を 1 サンプルあたり、平均 10,000 シーケンス数を目処に半導体シーケンサーを用いてシーケンスを行う。これらの配列について 96% の相同性に基づき類似の配列を群分けすることで、生物学的には種レベルと同等の分類となる Operation Taxonomic Unit (OTU) を構築し、各 OTU の代表配列を Human Oral Microbiome Database (HOMD)

のデータと 97% 以上の相同性で一致する細菌種に割り振ることでそれぞれの OTU に該当する細菌種を推定する。該当するものがない OTU については Ribosomal Database Project II のデータベースにて検索し、唾液細菌叢の細菌構成を決定する。



3) 菌種名が確定していない *Streptococcus* 属の分離同定

菌種名が確定していない *Streptococcus* 属について、細菌種毎に構成比率が高い被験者を選別し、再び唾液を採取して *Streptococcus* 属の選択培地である Mitis-Salivarius 寒天培地に塗布する。コロニー形態に注目してさまざまなコロニーをピックアップして培養し、染色体 DNA を抽出して 8F プライマーおよび 1492R プライマーを用いて 16S rRNA 断片を増殖し、サンガー法により塩基配列を決定する。1 細菌種について最低 5 株を目処として分離同定する。各株に共通する性状（糖代謝、酵素活性など）を細菌同定キットアピ ストレップ 20 を用いて調べ、新規の細菌種として登録する。

4. 研究成果

1) 学生の唾液細菌構成

学生 60 名の唾液細菌構成を細菌属別に示す（右図）。*Streptococcus* 属が最も多く、平均構成率は 24.6%、最大値は 43.4%、最小値は 12.3% であった。次に多かったのは *Prevotella* 属で、平均構成率は 12.2%、最大値は 31.1%、最小値は 0.3% であった。*Neisseria* 属がそれに続き、平均構成率は 10.4%、最大値は 25.3%、最小値は 0.2% であった。これら 3 菌属で約半分を占めた。さらに、平均構成比率が 1% を超える、あるいは、構成比率が 5% を超える被験者が存在するものを口腔内に優勢に存在する細菌として定義したところ、右表のように 13 属 24 種が認められた。平均構成率では *Neisseria flavescens* が最も多く、続いて *Streptococcus* sp. (423) がほぼ同値で続いた。これらの結果を健康な久山町住民（40 歳以上）の結果と比べてみると、年齢においては大きな違いがあるにもかかわらず、細菌属構成は非常に類似していた。細菌種構成に関しては、*N. flavescens* がともに第一位であったが、その他の細菌種については構成率に若干の違いが認められた。

また、優勢な細菌種構成に関しては、その中に菌種名が確定していないものが 9 菌種存在した。その内の 6 菌種が *Streptococcus* 属であり、平均の合計で約 17% であった。久山町住民の唾液細菌叢の結果からは 5 種類の菌種名が確定していない菌種が認められたので、ほぼ同様の結果であった。菌種名が確定していない 6 種類の *Streptococcus* 属菌種の中で、HOMD のデータベースと一致したものは HMT-423 と HMT-431 のみであった。優勢な細菌種には含まれなかったが、上記以外に HMT-058、HMT-070、HMT-056 が検出された。HOMD のデータベースは随時更新されており、最新版の Version 15.1 では HMT-431 は *Streptococcus infantis*、HMT-058 は *Streptococcus oralis*、HMT-070 は *S. oralis* と確定されている。現時点で HOMD のデータベースの中で菌種名が確定していない *Streptococcus* 属は 7 菌種である。

2) 医局員の唾液中の *Streptococcus* 属の割合

医局員 12 名から採取した唾液を用いて菌種名が確定していない *Streptococcus* 属について調べたところ、HMT-423、HMT-066 および HMT-061 が検出された。HMT-423 は平均構成率 9.1%（最大値 20.4%）、HMT-066 は平均構成率 1.8%（最大値 4.0%）、HMT-061 は平均構成率 0.03%（最大値 0.06%）であった。学生の結果と考え合わせて HMT-423 は唾液中に高い構成比率で存在すると考えられる。

3) 医局員からの釣菌結果

HMT-423 あるいは HMT-066 の構成率が最大であった者を含めて、5 名の医局員から菌種名が確定していない *Streptococcus* 属の釣菌を試みた。*Streptococcus* 属の選択培地である

学生唾液中の細菌属構成（平均構成率1%以上）

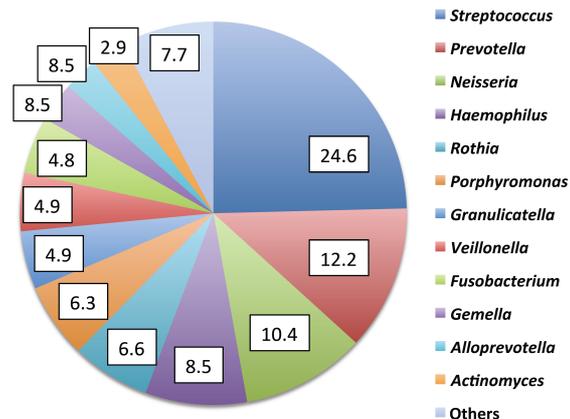


表 学生の唾液に優勢に存在する細菌種

細菌種	構成比率 (%)	
	平均	最大
<i>Neisseria flavescens</i> (610)	8.5 ± 5.2	21.4
<i>Streptococcus</i> sp. (423)	8.5 ± 5.0	25.9
<i>Haemophilus parainfluenzae</i> (718)	6.9 ± 3.3	17.3
<i>Rothia mucilaginosus</i> (681)	6.1 ± 5.3	29.8
<i>Prevotella melaninogenica</i> (469)	6.1 ± 4.7	21.4
<i>Veillonella rogosae</i> (158)	4.7 ± 2.7	12.1
<i>Fusobacterium periodonticum</i> (201)	4.6 ± 3.0	13.2
<i>Granulicatella adiacens</i> (534)	4.2 ± 2.0	11.1
<i>Porphyromonas pasteri</i> (279)	3.0 ± 2.4	11.2
<i>Streptococcus</i> sp. (431)	2.6 ± 1.4	6.4
<i>Streptococcus salivarius</i> (755)	2.4 ± 2.7	13.9
<i>Streptococcus</i>	2.4 ± 2.3	13.1
<i>Gemella sanguinis</i> (757)	2.0 ± 1.0	5.3
<i>Neisseria mucosa</i> (682)	1.6 ± 2.4	14.8
<i>Alloprevotella</i> sp. (473)	1.4 ± 1.8	8.5
<i>Streptococcus</i>	1.4 ± 1.4	8.5
<i>Streptococcus</i>	1.3 ± 1.5	7.7
<i>Gemella morbillorum</i> (046)	1.2 ± 1.1	5.4
<i>Prevotella histicola</i> (298)	1.2 ± 1.7	7.0
<i>Prevotella</i> sp. (313)	1.1 ± 2.3	16.0
<i>Actinomyces odontolyticus</i> (701)	1.0 ± 0.8	3.5
<i>Alloprevotella</i> sp. (308)	0.9 ± 1.1	7.3
<i>Streptococcus parasanguinis</i> _II (411)	0.8 ± 1.0	5.9
<i>Streptococcus</i>	0.7 ± 1.7	12.5

Mitis-Salivarius 寒天培地上で、*Streptococcus* 属のコロニーは大きく2つに分けることができる。ひとつは水色の大きなコロニーで、もうひとつは濃青色の中型あるいは小型のコロニーである。前者はサリバリウス菌群で後者はミティス菌群に相当する。HOMD のデータベースによると、菌種名が確定していない *Streptococcus* 属は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列がミティス菌群とより相関性が高いことから、釣菌する際には寒天培地上のコロニーの形態で鑑別可能なサリバリウス菌群は除外した。医局員 5 名から 61 個のコロニーを釣菌、培養、DNA 抽出、16S rRNA 遺伝子の増幅を行い、その塩基配列を決定して HOMD のデータベースで検索した結果、*Streptococcus mitis* 19 個、*Streptococcus parasanguinis* 10 個、*Streptococcus sanguinis* 8 個、*S. oralis* 11 個、*S. infantis* 3 個、*Streptococcus mutans* 1 個、*Actinomyces* sp. 1 個、*Neisseria subflava* 5 個、*Neisseria oralis* 2 個、*N. flavescens* 2 個であった。Mitis-Salivarius 寒天培地では *Streptococcus* 属以外の細菌属が 61 コロニー中 10 個存在し、特に *Neisseria* 属はコロニー形態で鑑別することは困難であった。

以上のように、菌種名が確定していない *Streptococcus* 属にファーストヒットするコロニーは存在しなかったが、*S. mitis* にファーストヒットした 16 個のコロニーは HMT-423 と 99.5% 以上の相関性を示し、ファーストヒットした菌種と約 1500 塩基中 1 塩基から数塩基の違いであった。また、*S. mitis* にファーストヒットした他の 3 個のコロニーは HMT-064 と 99.5% 以上の相関性を示した。HMT-423 と HMT-064 は *S. mitis* に極めて近縁の菌種である可能性が高いと考えられる。

4) 被験者から分離した *Streptococcus* 属菌種の生化学的性状

当教室で保存している標準株 4 菌種 (*S. mitis*、*S. tigurinus*、*S. infantis*、*S. oralis*) と今回釣菌した分離株の一部である 11 菌種 (C1~C4; *S. mitis* にファーストヒット、C5~C8; *S. oralis* にファーストヒット、C9~C11; *S. infantis* にファーストヒット、相関性は 99.5~99.9%) について、レンサ球菌および関連菌種の迅速同定に用いられるアピ ストレップ 20 により酵素活性や糖代謝などの生化学的性状を同定した。下図に示すように、標準株と口腔内から分離した菌株には 16S rRNA 遺伝子の塩基配列が 99.5% 以上相関性を有するにもかかわらず、異なる生化学的性状が認められた。例えば、*S. mitis* にファーストヒットした C1 から C4 については *S. mitis* 標準株が活性を有する -ガラクトシダーゼ活性を示したのは C1 のみで、反対に、標準株が活性を有しない -ガラクトシダーゼ活性を C3 と C4 が示した。*S. oralis* にファーストヒットした C5 から C8 についても標準株が活性を有しない -ガラクトシダーゼ活性を C5、C6 および C8 が示した。糖代謝に関しても菌株による違いが認められた。口腔内に存在する細菌は標準株とは異なる生化学的性状を有していることが明らかとなり、口腔内での細菌の相互作用にはこの点を考慮する必要があることが分かった。

表 被験者より分離した *Streptococcus* 属菌種の生化学的性状

Strain	VP	HIP	ESC	PYRA	αGAL	βGUR	βGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG	溶血反応
<i>S. mitis</i> ATCC 49456	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	α
<i>S. tigurinus</i> ATCC 15914	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	α
<i>S. oralis</i> ATCC 10557	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	α
<i>S. oralis</i> ATCC 35037	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	α
<i>S. infantis</i> ATCC 700779	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	α
C1	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	α
C2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	α
C3	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	α
C4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	α
C5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	α
C6	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	α
C7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	α
C8	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	α
C9	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	α
C10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	α
C11	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	α

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 山下 喜久

ローマ字氏名： Yamashita Yoshihisa

所属研究機関名： 九州大学

部局名： 大学院歯学研究院

職名： 教授

研究者番号(8桁)： 20192403

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。