

令和元年6月25日現在

機関番号：32710

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07200

研究課題名(和文) 炎症性腸疾患患者の口腔・腸内細菌叢の均衡と多様性についての基礎的研究

研究課題名(英文) Metagenomics on Oral Bacteria and Fecal Bacteria using a Next Generation Sequencing System

研究代表者

大塚 良子(Otsuka, Ryoko)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：00803701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、次世代シーケンサーを用いて炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease: IBD)患者と健康ボランティアの口腔内細菌叢と腸内細菌叢の均衡と多様性について検証を行った。その結果、IBD患者と健康ボランティアともに腸内細菌サンプル中に口腔細菌が存在することがわかった。さらにIBD患者および健康ボランティアの腸内における口腔細菌の細菌構造は異なることも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、IBDの患者数は急増しているにも関わらず、根本原因がわからないため、効果的な予防方法や根治療法は確立していない。本研究によりIBD患者の口腔および腸内細菌叢から細菌学的な知見が得られたことにより、予防方法や根治療法の発見の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Oral and fecal microbiota from volunteers having inflammatory bowel disease (IBD) were investigated using an advanced next generation sequencing technology and compared with those of healthy volunteers. Oral and fecal samples of ten healthy volunteers and 12 IBD volunteers were sequenced after extracting whole DNA using a 16S rRNA sequencing on the Ion Torrent Personal Genome Machine (I-PGM) System.

Streptococcus salivarius and Streptococcus oralis were detected in both oral and fecal samples collected from most volunteers in either group. Streptococcus mutans, Streptococcus gordonii and Actinomyces spp. were present in both samples of few volunteers. Granulicatella adiacens and Streptococcus salivarius were detected in both oral and fecal samples collected from three IBD volunteers. All volunteers from both groups had Streptococcus sinensis in their oral cavity. With few exceptions most volunteers had Streptococcus sinensis in their fecal samples.

研究分野：社会歯学

キーワード：口腔細菌叢 腸内細菌叢 炎症性腸疾患

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

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD) には、大腸で発症する潰瘍性大腸炎および消化管全域において発症するクローン病がある。いずれも下痢、血便や腹痛を伴った難治性慢性炎症疾患であるため国の難病(特定疾患)に指定されている。患者数はここ数十年で急増し、平成26年度末で21万人を超えた。本症の根本原因は未だ解明されていないが、遺伝的素因環境因子および免疫学的異常が絡み合って発症すると考えられている。

特に近年では、環境因子として腸内細菌叢の「均衡破綻と多様性の消失; dysbiosis」が過剰な免疫応答を促す要因として有力視されている。最近では、下記に示すように口腔細菌が腸内細菌のdysbiosisに関与し、過剰な免疫応答のトリガ - の1つであることが示唆される報告が相次いでいる (Akimatsu K et al Sci Rep 2014およびKojima A et al Sci Rep 2012)

2. 研究の目的

上記の背景により、炎症性腸疾患に関しても腸内細菌叢のdysbiosisに口腔細菌が関与している可能性が十分に考えられた。したがって、本研究では、「1) 口腔細菌叢のdysbiosisが、2) 腸内細菌叢のdysbiosisを惹起し、3) 炎症性腸疾患発症・再燃・重篤化に関与している」という仮説を検証する基礎的な研究を行った。

3. 研究の方法

上記の仮説を検証するために、12名のIBD患者と10名の健康ボランティアを対象とした観察研究を行った。

主要評価項目は、口腔内細菌叢と腸内細菌叢における口腔内病原細菌の質的・量的分布とした。副次的評価項目は歯周ポケット深さ (Pocket depth; PD)、bleeding on probing (BOP) と唾液分泌量とした。

具体的な研究デザインを以下に示す。東京医科歯科大学医学部附属病院潰瘍性大腸炎・クローン病先端治療センター外来来院患者で、寛解から軽症と診断されたIBD患者と健康ボランティアを対象に、口腔診査を行った。次に各被験者の口腔由来のサンプル (唾液、舌・歯周ポケット内のプラーク) と糞便サンプルを採取後、次世代シーケンサー (Next Generation Sequencing System) を用いてメタゲノム解析 (Ion PGM System) を行った。

4. 研究成果

歯周組織検査の結果 (表1)、IBD患者および健康ボランティアでは歯数およびPDについては有意差が認められなかった。BOPについてもIBD患者は健康ボランティアと比較して約11%高かったが、有意差は認められなかった。健康ボランティアのメタゲノム解析の結果、3名の口腔および糞便サンプルから *Streptococcus salivarius* および *Streptococcus oralis* が検出された。また1名からは口腔および糞便サンプルから *Streptococcus mutans* と *Streptococcus gordonii* を検出された。一方、IBD患者のメタゲノム解析の結果、*Granulicatella adiacens*、*Streptococcus salivarius* および *Streptococcus sinensis* が6名中3名の口腔および糞便サンプルから検出された。*Streptococcus sinensis* については、6名中5名が口腔および糞便サンプルの両方から、6名中1名が口腔サンプルのみから検出された。また *Streptococcus thermophilus* は、5名の糞便サンプルのみから検出された (右図)。

表1 IBD患者と健康ボランティアの歯数および歯周組織検査の結果

| | IBD患者 | 健康ボランティア |
|--------|-------------|------------|
| 歯数(本) | 28.7 ± 1.2 | 28.0 ± 0.0 |
| PD(mm) | 2.5 ± 0.2 | 2.2 ± 0.2 |
| BOP(%) | 26.7 ± 12.1 | 17.1 ± 8.0 |

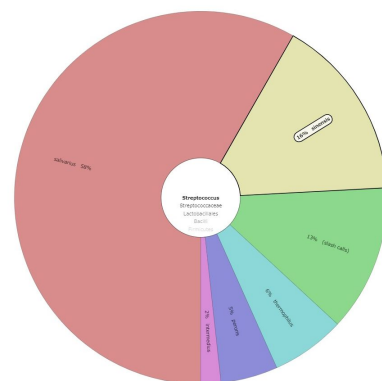


図 メタゲノム解析結果の一例 (Krona Chart)

以上の結果から、健康ボランティアおよびIBD患者ともに腸内細菌サンプル中に口腔細菌が存在することがわかった。しかし、健康ボランティアおよびIBD患者の腸内における口腔細菌の細菌構造は異なることも明らかになった。多様な腸内細菌叢に影響を及ぼす因子の探索およびIBDの病態の解明につながることを期待する。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yoshiaki Nomura, Tomoaki Matsuyama, Kakuhiro Fukai, Ayako Okada, Mitsuo Ida, Noriaki Yamauchi, Hiroyuki Hanamura, Yoshihide Yabuki, Kazuhiko Watanabe, Motoko Sugawara, Yasuhiko Imanishi, Norihiro Koizumi, Yoshinori Murano, Atsushi Nishiyama, Yoshiteru Fukukawa, Ryoko Otsuka, Nobuhiro Hanada. Precede-Proceed model based questionnaire and saliva tests for oral health checkup in adult. Journal of Oral Science, 2019 in press. 査読あり

Khairul Matin, Thwe Zin Ei, Ryoko Otsuka, Ayako Okada, Kenichi Nebuka, Nobuhiro Hanada, Junji Tagami. Confocal Laser Microscopic Images of In Vitro Cariogenic Biofilm and Resulted Demineralized Dentin. Journal of Oral Health & Dentistry, 2018 1(2): 39-41 査読あり

〔学会発表〕(計 10 件)

Ryoko Otsuka, Khairul Matin, Ayako Okada, Meu Ariyoshi, Kosuke Tanimoto, Junji Tagami, Nobuhiro Hanada. Metagenomics of Oral and Intestinal Bacteria using a Next Generation Sequencing System; Preliminary Report. The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research 2018 年.

Ayako Okada, Takatoshi Murata, Meu Ariyoshi, Ryoko Otsuka, Mamiko Yamashita, Miki Kosaka, Masayuki Suzuki, Ken Tateno, Rumi Wakiyama, Megumi Suzuki, Hitomi Aoyagi, Hiromi Uematsu, Akiko Imamura, Tsutomu Sato, Hiroshi Kawahara, Khairul Matin, Nobuhiro Hanada. The Random Allocation Process in a Randomized Clinical Trial ; Effectiveness of Periodontal Health Improvement on Vascular Endothelial Function. The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research 2018 年.

大塚良子, 今井 奨, 岡田彩子, 有吉芽生, 菊地朋宏, 宮之原真由, 曾我部薫, 村田貴俊, マテイン カイルール, 野村義明, 花田信弘, 桃井保子, 熊谷 崇. がん治療周術期における口腔内環境の変化 1 症例報告 第 2 報. 第 67 回日本口腔衛生学会・総会 2018 年.

岡田彩子, 村田貴俊, 有吉芽生, 大塚良子, 山下万美子, 鈴木 恵, 青柳ひとみ, 植松裕美, 今村安芸子, 佐藤 勉, カイルール マテイン, 花田信弘. 喫煙者の口腔ケアと歯周組織の健康状態との関連性について. 第 67 回日本口腔衛生学会・総会 2018 年.

有吉芽生, 村田貴俊, 岡田彩子, 大塚良子, 山下万美子, 鈴木 恵, 青柳ひとみ, 植松裕美, 今村安芸子, 佐藤 勉, カイルール マテイン, 花田信弘. 血管内皮機能に対する歯周組織健康状態改善の有効性評価:ランダム化並行群間比較試験(第一報). 第 67 回日本口腔衛生学会・総会 2018 年.

上谷公之, 大塚貴俊, 矢吹義秀, 福澤洋一, 古藤真実, 吉野浩和, 三穂乙暁, 西辻直之, 谷村秀樹, 長井博昭, 小石 健, 大塚良子, 岡田彩子, 岡本公彰, 野中衣理加, 村田貴俊, 野村義明, 花田信弘. 唾液を用いた歯周病のスクリーニング検査による地域健康診断システム構築~平成 29 年度までの実施結果報告~. 第 67 回日本口腔衛生学会・総会 2018 年.

引地清水, 大塚良子, 岡田彩子, 桃井保子. 隣接面のプラークコントロールに関する研究 第 10 報:ゴム製歯間ブラシによる人工歯隣接面のプラーク除去率. 日本歯科保存学会 2018 年度春期学術大会(第 148 回) 2018 年.

村田貴俊, 岡田彩子, 有吉芽生, 大塚良子, 山下万美子, 鈴木 恵, 青柳ひとみ, 植松裕美, 今村安芸子, 佐藤 勉, マテイン カイルール, 花田信弘. 血管内皮機能に対する歯周組織健康状態改善の有効性評価:ランダム化並行群間比較試験(ベースライン分析). 第 19 回日本口腔機能水学会・学術大会 2018 年.

大塚良子, 今井 奨, 阿部 繭, 岡田彩子, 有吉芽生, 菊地朋宏, 村田貴俊, マテイン カイルール, 野村義明, 花田信弘, 桃井保子, 熊谷 崇. がん治療周術期における口腔内環境の変化 1 症例報告. 第 66 回日本口腔衛生学会・総会 2017 年.

岡田彩子, 有吉芽生, 曾我部薫, 大塚良子, 宮之原真由, 村田貴俊, マテイン カイルール, 花田信弘. Liquid Carrier Type 3DS トレーを用いた殺菌洗口液の細菌学的・臨床的效果. 第 66 回日本口腔衛生学会・総会 2017 年.

〔図書〕(計 1 件)

武内博朗, 野村義明, 花田信弘, 今井 奨, 大塚良子, 岡田彩子, 岡本公彰, 加藤大明, 宮之原真由, 村田貴俊, 山田秀則. 医学情報社. 患者さんへの“ベストアンサー”シリーズ 11 “老化の予防”歯科 Q&A 口の健康が生活習慣病を防ぎます. 2018 年. 42 ページ.

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。