

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10421

研究課題名(和文) 口腔細菌叢のメタゲノム解析によるドライマウスの病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of connection between oral microbiome and dry mouth using metagenomic analysis

研究代表者

金子 昇 (Kaneko, Noboru)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：00397126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔細菌叢とドライマウスに伴う口腔症状との関連性について検討を行った。まず洗口サンプルがドライマウス患者からの採取検体として適していることを確認した。その後、口腔乾燥群と正常群で洗口サンプルの菌叢解析を行ったが、多様性指標のShannon Entropyで2群間に有意差は認められなかった。また多様性指標のWeighted Unifrac距離においても同様であった。ただ、口腔乾燥で強い舌痛を訴える患者の主成分は他の対象者と離れた位置にプロットされた。この患者においてはStreptococcusの割合が他の対象者に比べて高く、その内anginosus groupの比率が特に高い値を示していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者の増加に伴いドライマウス患者が増加している。ドライマウスに伴う口腔症状としては舌痛等の粘膜症状があり、これまで、こうした粘膜症状に関わる口腔細菌としては、カンジダ菌が挙げられていた。本研究により、それらに加えて口腔細菌叢の組成の変化と一部のレンサ球菌が粘膜症状に関わっている可能性が示唆された。また、口腔粘膜症状のあるドライマウス患者に対して苦痛なく口腔細菌叢を調べるための検体として、洗口サンプルを用いることの妥当性が確認された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationship between oral microflora and oral symptoms associated with dry mouth. First, we confirmed that mouthrinsed samples (spitted solution after mouthrinsing) were suitable as specimens collected from patients with dry mouth by comparing them with the microflora of stimulated saliva. Afterwards, microbiome analysis of the mouth rinsed samples was conducted between the xerostomia group and the normal group. No significant difference was observed between the two groups in Shannon Entropy, an alpha-diversity index. Furthermore, no clear difference was observed in Weighted Unifrac distance, which is a beta-diversity index. However, the principal component for patients who complained of severe tongue pain due to dry mouth was plotted at a location far away from that of other subjects. In this patient, the proportion of Streptococcus was higher than in other subjects, and among these, the proportion of the anginosus group was particularly high.

研究分野：予防歯科学

キーワード：ドライマウス 菌叢解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、高齢者の増加に伴ってドライマウス患者が増加しており、我が国における潜在的なドライマウス患者は3000万人とも言われている(真下純一ら:老年歯学 23: 319-329, 2008)。ドライマウスに伴う症状としては、口渇や会話困難、乾いた食物が食べにくい等の唾液の潤滑作用が失われた事によるものだけではなく、唾液の粘稠感や粘膜のヒリヒリ感、疼痛等、単なる乾燥だけでは説明できないものも多い。こうした症状は従来、カンジダ菌により説明されてきた(Shinozaki S et al. Oral Dis 18: 667-672, 2012、Tooyama H et al. BMC Oral Health 15: 150, 2015)。しかしその一方で、口腔内からカンジダ菌が検出されないケースも多く、他の細菌による口腔症状への関与が疑われた。

医学系、特に腸内細菌の分野では、糞便の網羅的な菌叢解析を行うことで、炎症性腸疾患(Quince C et al. Am J Gastroenterol 110: 1718-1729, 2015)やアレルギー(Hua X et al. EBioMedicine 3: 172-179, 2016)、自己免疫疾患(Chen B et al. J Autoimmun 83: 31-42, 2017)等の疾患で、腸内細菌叢が疾患に大きく関わっている事が明らかにされている。細菌叢を詳細に把握することの必要性が認識され、宿主要因・細菌叢・疾患のデータベースを構築する動きもある。一方、口腔内ではカンジダ菌や溶血性レンサ球菌、う蝕原性菌としてのミュータンスレンサ球菌や乳酸桿菌、一部の歯周病原性菌等の特定の菌の組み合わせでドライマウスとの関連性が調べられたに過ぎず(Almstahl A et al. J Dent Res 78(8): 1410-1416, 1999、Almstahl A et al. J Rheumatol 26: 110-114, 1999、Almstahl A et al. Oral Health Prev Dent 3: 67-76, 2005、Eliasson L et al. J Dent Res 85: 334-338, 2006、Khovidhunkit SO et al. J Med Assoc Thai 92: 1220-1228, 2009、Almstahl A et al. Arch Oral Biol 60: 1187-1195, 2015)。その他多数の細菌からなる口腔細菌叢がドライマウスの病態に及ぼす影響は、多くが未解明のままであった。

2. 研究の目的

ドライマウス患者の口腔細菌叢を網羅的に解析し、舌痛や頬粘膜痛等の口腔症状に関わる細菌構成を明らかにすることを目的とした。

これまでは多数の菌種を含む細菌叢を詳細に調べることが技術的に困難であったため、ドライマウスの病態と口腔細菌叢との関連性については、一部の細菌で調べられたのみであった。ところが近年、次世代シーケンサーの登場により多数の菌種からなる細菌叢を網羅的に解析することが可能となった。菌種毎で保存性が高い領域である16S rRNA遺伝子を、多数の菌種由来DNA混合物を鋳型としてユニバーサルプライマーでPCR増幅し、得られた増幅断片を大量に配列解析することで、元々のDNA混合物中の細菌組成を調べることができる(Petrosino JF et al. Clin Chem 55: 856-866, 2009)。16S rRNA遺伝子は、保存性の高い領域と菌種毎に多様性のある領域が交互に並んだ構造をしているが、2~3箇所の多様性領域を含む領域を標的として解析することで、9割以上の菌株で属を、約8割の菌株で菌種までを正確に同定・分類することが可能であり(Nakayama J Bioscience Microflora 29(2): 83-96, 2010)。これまでの菌叢解析とは別次元の詳細な情報を得ることが可能である。

ドライマウスは複雑な病態を持つ疾患であり、これまで調べられて来たごく一部の細菌のみが口腔症状に関与しているとは考えにくく、これまで見落とされてきた細菌について口腔症状との関連性を分析することで、ドライマウスに対する新たな治療法や予防法の開発に繋がることが期待された。

3. 研究の方法

(1) 洗口サンプルの妥当性の検討

通常、口腔内細菌の検体採取としては、唾液採取や擦過サンプルを使用することが多い。ただ、今回はドライマウス患者から検体を採取するため、唾液を献体として使用することが難しい。また、ドライマウス患者は粘膜が過敏になっている方も多く、粘膜を擦過することは負担を強いる

ことになりうる。さらに擦過サンプルは部位によって菌叢が大きく変化することが予想されることから、今回は一定時間洗口した後に吐き出してもらう洗口サンプルを使用することとし、洗口サンプルと刺激唾液サンプルの菌叢比較を比較することで、洗口サンプルを使用することの妥当性を検討した。

新潟大学医歯学総合病院予防歯科外来を受診する患者 9 名を対象とし、滅菌超純水 10 ml を 20 秒間洗口後に回収した洗口サンプルおよびパラフィンガム咀嚼による 3 分間刺激唾液を採取した。

洗口サンプルおよび刺激唾液から DNA 抽出を行い、16S rRNA 遺伝子の V1-V2 領域に注目したメタゲノム解析を行った。なお、サンプルから V1-V2 領域の塩基配列データの生成は、日本ジェネティクス株式会社の受託サービスを用いた。

得られた塩基配列のデータは、Qiime 2 を用いて菌叢解析を行った。また、菌種同定のための 16S rRNA データベースとして、SILVA 138-99 を使用した。

(2) ドライマウス群と健常者群の比較

新潟大学医歯学総合病院予防歯科外来を受診する 50 歳以上の患者を対象に、安静時唾液流量が 0.1 ml/分未満のドライマウス群と 0.1 ml/分以上の健常者群から上述の方法で洗口サンプルを採取した。また、菌叢解析についても同様の方法で行った。

なお次世代シーケンサーによる菌叢解析では、菌叢を構成する細菌の比率は求まるが、絶対量としての菌数は求まらない。そのため、血液寒天培地にサンプルを接種し、簡易嫌気培養を行うことで総菌数を測定した。また、16S rRNA 遺伝子に注目した解析では、カンジダ菌についての結果が得られないため、CHROMagar カンジダ II 寒天培地にサンプルを接種することでカンジダ菌の菌数を測定した。

4. 研究成果

(1) 洗口サンプルの妥当性の検討

対象者 9 人 (男性 2 人、女性 7 人、70.3 ± 12.9 歳) における洗口サンプルと刺激唾液サンプルの菌叢を分類レベル別に図 1 ~ 3 に示す。

各対象者における洗口サンプルの構成細菌と刺激唾液の構成細菌は、若干の相違は見られたが概ね良く対応していた。

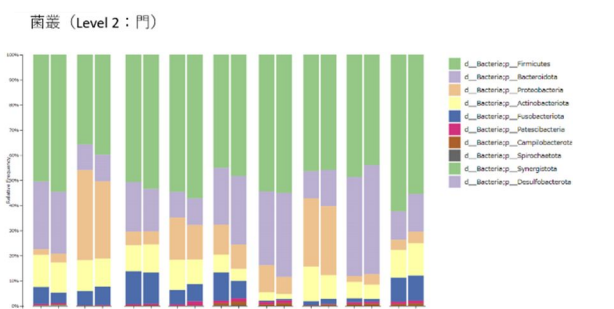


図 1. 洗口サンプルと刺激唾液の菌叢比較 (Level 2 : 門レベル)

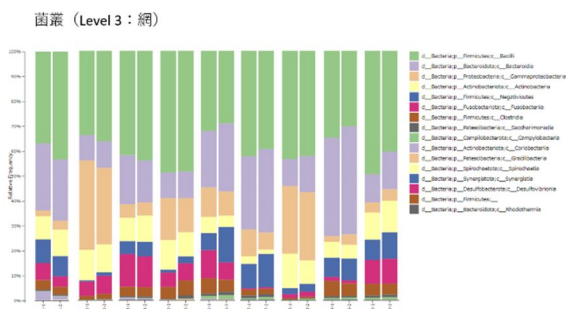


図 2. 洗口サンプルと刺激唾液の菌叢比較 (Level 3 : 綱レベル)

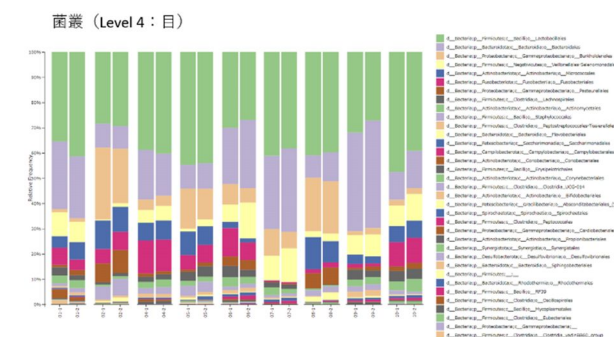


図 3. 洗口サンプルと刺激唾液の菌叢比較 (Level 4 : 目レベル)

続いて、サンプル中における菌叢の多様性を表す指標である 多様性を各サンプルについて算出し、各対象者の洗口サンプルと刺激唾液との対応を見た（図4～6）。その結果、いずれの多様性指標も洗口サンプルと刺激唾液間で高い相関関係を示し、Observed Features で $r=0.969$; $p<0.01$ 、Shannon Entropy で $r=0.939$; $p<0.01$ 、Faith Phylogenic Diversity で $r=0.978$; $p<0.01$ であった。

以上の結果から、洗口サンプルは刺激唾液とほぼ同様の細菌叢で構成されており、唾液をサンプルとすることが困難なドライマウス患者で菌叢解析を行う上で有効な検体であると考えられた。

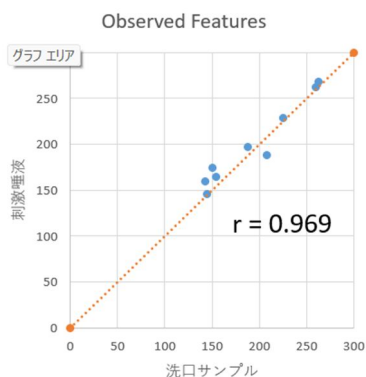


図4. 洗口サンプルと刺激唾液の 多様性比較 (Observed Features)

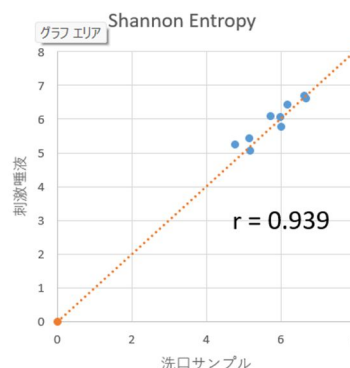


図5. 洗口サンプルと刺激唾液の 多様性比較 (Shannon Entropy)

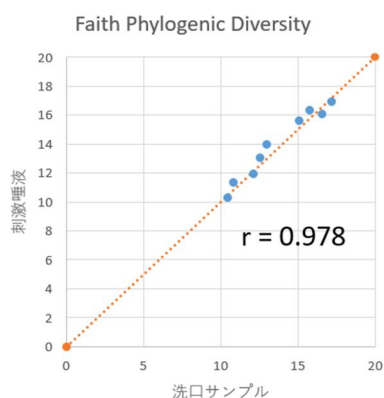


図6. 洗口サンプルと刺激唾液の 多様性比較 (Faith Phylogenic Diversity)

(2) ドライマウス群と健常者群の比較

ドライマウス群（安静時唾液 0.1 ml/分未満）6名と健常者群（安静時唾液 0.1 ml/分以上）5名を対象とし、洗口サンプル中の総菌数、Candida 菌数の比較を行った（図7, 8）。その結果、ドライマウス群で Candida の平均菌数が高い値を示したが、統計学的に総菌数、Candida 菌数ともに有意差は認められなかった。

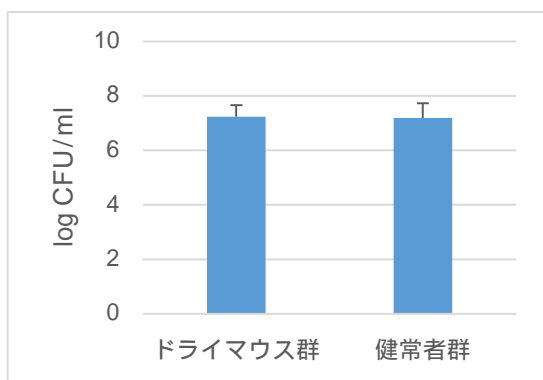


図7. 洗口サンプルにおける総菌数

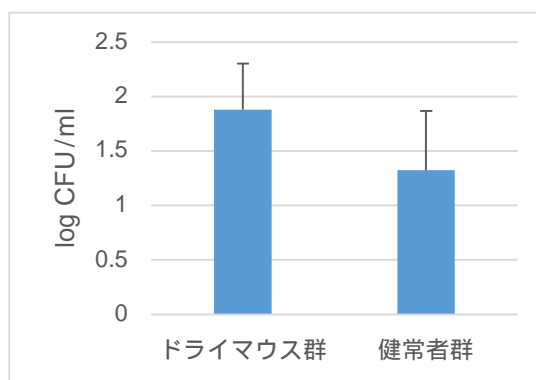


図8. 洗口サンプルにおける Candida 菌数

続いて菌叢解析を行った結果、多様性指標の Shannon Entropy はドライマウス群で 5.71 ± 0.49 、健常者群で 5.75 ± 0.20 であり、構成する菌叢の多様性に有意差は見られなかった。また、多様性を表す Weighted Unifrac 距離の主成分分析の結果においてもドライマウス群と健常者群とで明確な差は認められなかった（図 9）。ただ、口腔乾燥による強い舌痛を訴える 1 名の患者の主成分は、他の対象者の主成分と離れた位置にプロットされていた。この患者の構成細菌に注目すると、通常、Streptococcus の割合は 30~40% の範囲に収まる者が多いが、この患者においては Streptococcus の割合が 57% を占めており、そのうち、anginosus group の菌の全菌数にしめる比率が 7.69% と、他の者（0~0.33%）に比べ特に高い値を示していた。anginosus group に属する *S. anginosus* や *S. intermedius* は、日和見的に口腔内や深部臓器などで化膿性疾患を引き起こす細菌である。粘膜症状を訴えるドライマウス患者において、今後も口腔内の菌叢解析調査を行っていく必要性が示唆された。

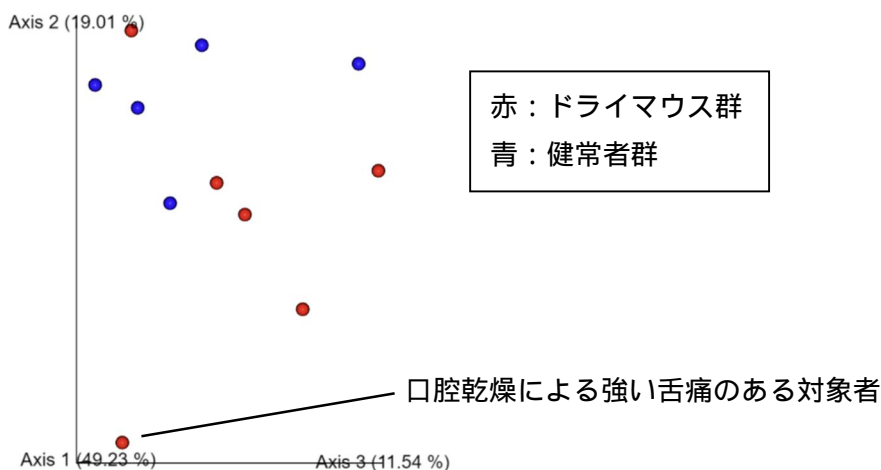


図 9. Weighted Unifrac 距離の主成分分析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshimoto T, Hasegawa Y, Furihata M, Yoshihara A, Shiramizu M, Sta Maria MT, Hori S, Morikawa M, Marito P, Kaneko N, Nohno K, Nose H, Masuki S, Ono T	4. 巻 19
2. 論文標題 Effects of Interval Walking Training on Oral Health Status in Middle-Aged and Older Adults: A Case-Control Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Environ Res Public Health	6. 最初と最後の頁 14465
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijerph192114465	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ito K, Izumi N, Funayama S, Nohno K, Katsura K, Kaneko N, Inoue M	4. 巻 18
2. 論文標題 Characteristics of medication-induced xerostomia and effect of treatment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ProS One	6. 最初と最後の頁 e0280224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0280224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Thwin KM, Tun TZ, Kaneko N, Nohno K, Ogawa H	4. 巻 35
2. 論文標題 Clinical and Microbial Evaluation of Dental Caries Status and Associated Factors Among Primary Schoolchildren in Myanmar: A Cross-Sectional Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Asia Pac J Public Health	6. 最初と最後の頁 42-49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/10105395221139347	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Katsura K, Funayama S, Ito K, Nohno K, Kaneko N, Takamura M, Soga M, Kobayashi T, Hayashi T	4. 巻 37
2. 論文標題 Radiological imaging features of the salivary glands in xerostomia induced by an immune checkpoint inhibitor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Radiol	6. 最初と最後の頁 531-536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11282-020-00480-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Thwin KM, Lin WT, Kaneko N, Nohno K, Ogawa H	4. 巻 20
2. 論文標題 Anti-carries and anti-microbial effects of school-based fluoride programs in Myanmar school children	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oral Health Prev Dent	6. 最初と最後の頁 165-172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3290/j.ohpd.b2960285.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihara A, Kaneko N, Miyamoto A, Nohno K	4. 巻 56
2. 論文標題 Interaction between and impact of IL-6 genotype and -tocopherol levels on periodontal condition in aging individuals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 139-146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Y, Kakuta E, Kaneko N, Nohno K, Yoshihara A, Hanada N	4. 巻 10
2. 論文標題 The Oral Microbiome of Healthy Japanese People at the Age of 90	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 6450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihara A, Kaneko N, Nohno K, Iwasaki M	4. 巻 46
2. 論文標題 Interaction between beta-3 adrenergic receptor genotype and environmental factors on periodontal progression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Periodontol	6. 最初と最後の頁 623-630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcpe.13115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 伊藤加代子, 泉 直子, 濃野 要, 船山さおり, 金子 昇, 井上 誠
2. 発表標題 薬剤性口腔乾燥症患者の特性および治療による自覚症状改善に関する検討
3. 学会等名 令和4年度老年歯科医学会第33回学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濃野 要, 金子 昇, 伊藤加代子, 船山さおり, 葭原明弘, 小川祐司
2. 発表標題 地域在住高齢者における刺激唾液量の減少に関連する因子の探索 1年縦断調査
3. 学会等名 第70回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星野剛志, 金子 昇, 葭原明弘, 諏訪間加奈, 小川祐司
2. 発表標題 高齢者における血漿中抗Porphyromonas gingivalis抗体価と心房細動との関連
3. 学会等名 令和3年度第1回新潟歯学会例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市川 優, 金子 昇, 濃野 要, 小川祐司
2. 発表標題 高齢者における唾液中抗Streptococcus mutans特異抗体を用いた根面う蝕発生リスクの検討
3. 学会等名 令和3年度新潟歯学会第2回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hoshino T, Kaneko N, Yoshihara A, Suwama K, Ito Y, Tanaka J, Narita I, Ogawa H
2. 発表標題 Associations of Antibody Levels to Porphyromonas gingivalis and Atrial Fibrillation
3. 学会等名 34th Annual Scientific Meeting of the International Association for Dental Research (IADR) SEA (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ichikawa Y, Kaneko N, Yamaga T, Yoshihara A, Suwama K, Odajima A, Minagawa K, Ogawa H
2. 発表標題 Association between dry eye symptoms and periodontitis in community-dwelling elderly in Japan: A population-based crosssectional study
3. 学会等名 International Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	濃野 要 (Nohno Kaname) (80422608)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------