

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592652

研究課題名（和文） 大規模集団に適応できる口腔内細菌叢解析システムの構築

研究課題名（英文） Development of a method for analysis of oral microbiota applicable to a large-scale population

研究代表者

中野 善夫（NAKANO YOSHIO）

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：80253459

研究成果の概要（和文）：

口腔内には常時数百種の細菌が存在している。これらの菌種の変動を効率良く解析するために制限酵素末端断片長解析法（Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism; T-RFLP）を用いて菌種その割合の推定を計算するシステムの構築を行なった。T-RFLP 法はピークの重なりがあつて各菌種の割合を推定するのが難しいのが欠点であるが、それを乱数を用いたシミュレーションを繰り返すことで最適な計算結果を求める Monte Carlo 法を使って解決した。その解析を行なうための口腔内細菌および口腔内細菌と密接な関係のある腸内細菌の 16S rRNA データベースを構築した。

研究成果の概要（英文）：

There are several hundreds species of oral bacteria in human oral cavities. We constructed a system for effective calculation using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP, in order to calculate compositions of oral microbial species. We succeeded in estimating compositions of bacterial species by a Monte Carlo algorithm. This program estimates proportional compositions by minimizing distances between peak values and the relative abundance of each group, containing several species, estimated from peak areas of capillary electrophoresis for T-RFLP analysis. In addition, databases of 16S rRNA sequences from oral and intestine microbiota to calculate bacterial composition by T-RFLP analyses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：予防歯科学

## 1. 研究開始当初の背景

口腔内細菌は多種多様な種が複雑な相互作用に基づく生態系を構築しており、バイオフィルムもその形態の一つである。菌の種

類は 700 を超え、その半分以上が未だ培養できていないといわれる。分析・解析技術の発達に伴い、ある環境下での細菌叢を培養に依存せず、網羅的かつ継時的に把握していく

研究が注目されている。歯科においては、口腔内のさまざまな疾患、特に歯周病は1種の細菌が引き起こすのではなく、複雑な構成の細菌叢と宿主との相互作用から生じるという認識があるにもかかわらず、本格的に口腔内細菌叢を網羅的に捕らえようという研究は日本ではまだ少ないのが現状である。確立された研究手法が普及しておらず、結果の解釈が曖昧で判りにくいこともその原因の一つであると思われる。本研究では、先入観にとらわれずに口腔内細菌叢を網羅的に解析するために統計的な計算に基づくパターン認識を応用する方法を開発することを目標とする。

## 2. 研究の目的

申請者らはすでにさまざまな細菌叢の解析に利用されている制限酵素末端断片長解析法 (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism; T-RFLP) に着目し、分析精度の向上と口腔内細菌 16S rRNA データベースの構築、およびそれに基づく菌種推定プログラムの開発に取り組んできた。この方法は、16S rRNA の塩基配列に保存性の高い領域と菌種によって配列が大きく異なる領域があることを利用し、高保存領域に蛍光標識プライマーを設計して増幅した DNA 断片を制限酵素で切断したときに非保存領域における切断パターンの違いにより菌の推定を行う方法である [図 1]。申請者らは、塩基種や蛍光標識物質の分子量の違いを考慮した計算、新しい分子量マーカの工夫などにより、T-RFLP の分析精度を従来用いられているものにくらべて格段に向上させることができた。さらに、異なる蛍光色素で両端を標識した増幅断片を用い、複数のサンプル間のピーク面積の変動パターンから両端の断片対を推定する方法を導入することで、100~150 程度の T-RFLP 解析を一括処理する方法を開発してきた。

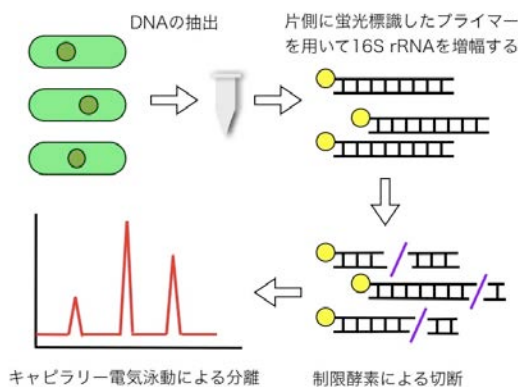


図 1. T-RFLP 法の原理

これまでに申請者ら 1000 を超す唾液サ

ンプルの細菌叢解析を行ってきた。そこで直面したことは、従来の解析法では数百、数千のサンプルの細菌叢解析は困難であるということである。それらは主にサンプル解析時間の問題、解析プログラムの自動化 (連続処理)、ピークアラインメントの精度および処理能力の限界などに起因する。そこで、一つの分析試料を解析する場合の分析精度・分析速度の向上については概ね所期の目標を達成できたところで、次の目標を多数のサンプルの効率的な解析と比較解析とする。大規模集団から得たサンプル中の細菌叢と個人の口腔内あるいは全身の健康状態との関係の解析を実現するためである。大量サンプル分析に際して最大の問題となるのは、多サンプルの結果から得られる多数のピークの対応付けと多サンプルの連続解析の二点である。実際に複数のサンプルを比較しようとして最初に直面する困難が、サンプル間での多数の密接するピークの対応付けである。キャピラリー電気泳動で検出するピークの出現位置はたとえ 0.1% のずれであっても毎回数値は変わってくる。このピーク帰属作業はアラインメントと呼ばれている作業である。次にアラインメント後のピーク値 (泳動時間とピーク面積) を用いて、菌種とそれぞれの割合の推定を行なうことになるが、これも 1 サンプルずつ表計算ソフトなどで処理している、多数の分析結果の効率的な比較解析はできない。

そこで、本研究では以下の方法で、規模と処理速度の問題の解決を目指す。

- (1) ピーク出現密度によるピークのアラインメント。
- (2) 相関係数行列による菌種とその割合 (相対比) の推定。
- (3) Monte-Carlo 法による菌種とその割合 (相対比) の推定。
- (4) 口腔内細菌の 16S rRNA データベースの充実。

以上の手法を用いて効率的な大規模菌叢解析システムの構築を目的とし、数百から 1000 サンプル程度の規模のサンプルの解析が 5~10 分程度で完了することを目標とする。

本システムは WWW サーバ上で稼働させネットワークを介して利用するように設計するので、動作確認後インターネットで公開し歯科学界をはじめ誰でも利用できるように公開する。

## 3. 研究の方法

- (1) 唾液中の細菌からの DNA 抽出と PCR  
唾液 0.5 mL を採取し、遠心分離 (20000 ×g, 15 min) で沈澱を回収して 150 μL の溶菌緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, and 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) pH

7.6) に溶かした。90°Cで10分間保持した後、マイクロチューブ中で0.3 gのジルコニアビーズと共に激しく浸透させ細菌を破壊した。遠心分離後、フェノール/クロロホルム抽出を行なった後、エタノール沈澱でDNAを回収し、保存した。

(2) T-RFLP 反応

上記サンプルを100 μLのTE緩衝液に溶解したものから、FAM標識8Fbacプライマー(5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3')とHEX標識806Rbacプライマー(5'-GGA CTA CCR GGG TAT CTA A-3')を使って16S rRNA領域を増幅した。得られたPCR断片をHaeIII, AluI, RsaI, Tsp509Iで切断し、ABI 3130 genetic analyzerでT-RFLP解析を行なった。

(3) 断片長照合

口腔内細菌866種の16S rRNA遺伝子PCR断片の制限酵素(AluI, HaeIII, RsaI, Tsp509I)切断末端断片長を計算し、MySQLデータベースとし、さらにキャピラリー電気泳動における移動度に影響のある分子量で補正した値を収納した。後に記すMonte Carlo法を用いた菌叢解析プログラムで、±100 bpのウィンドウ幅で照合し、菌種推定に用いた。

(4) 菌種推定と含有率計算法

4種の制限酵素で増幅16S rRNA遺伝子断片を切断し、蛍光標識した末端の断片をキャピラリー電気泳動で解析して、菌種と含有率を推定する手順を図2に示した。4種のそれぞれの制限酵素末端断片の解析値をデータベースと照合しそれぞれの候補を選び、次に4種の制限酵素で選ばれた菌種グループに共通する菌種を最終候補として選んだ。重複のある各ピークのピーク面積はそれぞれの菌種由来のピーク面積の合計となるので、ピークKのピーク面積 $a_k$ は

$$\sum_{i \in \text{groups of peak}} x_i = a_k$$

と表現できる。ここで、 $x_i$ はピークKに対応する*i*番目の菌種に由来する面積。ピーク面積と菌種の関係は、それぞれのピーク面積を*b*、各菌種の割合を*x*とすると、

$$a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + a_{13}x_3 + \dots + a_{1n}x_n = b_1$$

$$a_{21}x_1 + a_{22}x_2 + a_{23}x_3 + \dots + a_{2n}x_n = b_2$$

⋮

$$a_{m1}x_1 + a_{m2}x_2 + a_{m3}x_3 + \dots + a_{mn}x_n = b_m$$

となるが、測定誤差等の理由でこの連立方程式の解が一義的に求められる確率はほぼゼロである。そこで、

$$L(\{x_i\}) = \sum_k \left( \sum_{i \in \text{groups of peak } k} x_i - a_k \right)^2$$

の値を最小になるように $x_i$ の値を振って最適買いを求めることにした。ランダムに30回 $x_i$ に値を割り振って最小のピーク面積が得られる組合せを選び、ついでランダムに $x_i$ に0.5を足したセットを作り30回、次に0.1を追加し30回、最後に0.01で30回の計算を行ない、最小値を求めた。

この計算はLAPACKライブラリを用いたRubyスクリプトで計算した。

全体の流れをまとめると、図2のようになる。

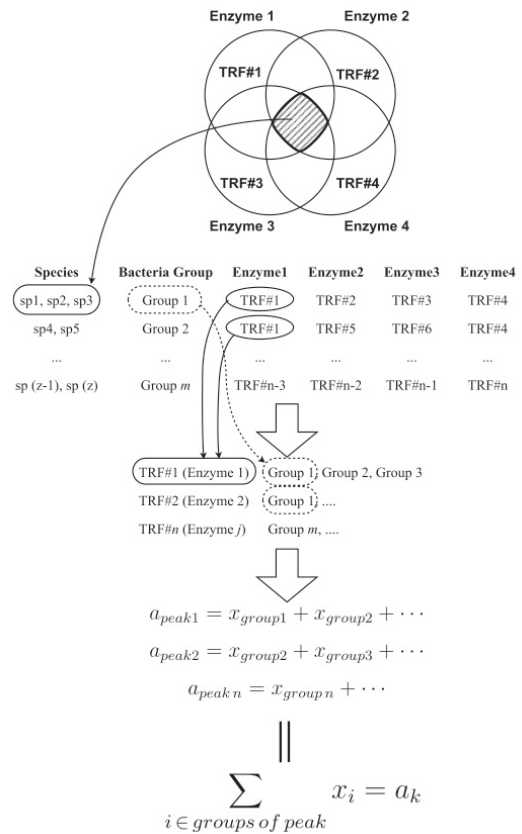


図2 ピークに対応する菌種の推定とピーク面積の対応

#### (4) 主成分分析

菌の含有率の主成分分析はRを用いて計算した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 多検体ピークパターンの比較による各ピークのアラインメント

蛍光標識された PCR 増幅産物を異なる制限酵素で切断した場合、同一菌種由来の標識末端断片は全体の断片種パターンの中で同一の挙動をとるという予想に基づき、サンプル中の菌種とその構成比を計算する方法については、すでに報告している (T. Takeshita, Y. Nakano, T. Kumagai, M. Yasui, N. Kamio, Y. Shibata, S. Shiota, and Y. Yamashita. 2009. Ecological proportion of indigenous bacterial populations in saliva correlated with oral health status. ISME J. 3: 65-78)。報告のプログラムで 100~150 サンプル程度の計算は 10 秒以内に完了するものが作れたが、実際に菌叢解析に使用しているうちに、サンプル数がおよそ 300 を超えるようになってくると、サンプル間のピークのアラインメントが困難になってくるといふ問題が明らかになった。それは、サンプル数が増えるにつれて、ピークが密集する領域では本来分離すべきピークが融合してきてしまうからである。そこで、今回はピークの分布密度に基づくアラインメント方法を開発し、300 を超える数のサンプルを解析したピークにも対応できるようにした。目標の 1000 サンプルについては、おそらく対応かろうだが、実際に 1000 サンプルの蓄積が間に合わず検証ができなかった。作成したプログラムは誰でもりようできるように <http://trf-alignment.appspot.com/> で公開した。

##### (2) Monte Carlo 法を用いた菌種含有率の計算

スクリプト言語 Ruby を使い Monte Carlo 法に基づき T-RFLP 解析結果からピーク面積比と T-RF 断片分子量データベースより口腔内細菌の含有率を予測するプログラムを作成した。3 人の被験者からそれぞれ 12 の唾液サンプルを採取し、合計 36 サンプルの口腔内細菌叢の解析を行なった。その結果を示したのが表 1 である。結果として 32 菌種の細菌の分布が明らかになった。さらに、これらの細菌叢をクローニング後に塩基配列を決定する方法でも分析を行い、互いの結果が概ね一致することが判った (本報告書では詳細は省略)。このことから、Monte Carlo 法に基づく本解析プログラムは細菌の含有率を推定するのに十分な機能を有していることが明らかになった。時間と手間と費用を投入してクローンのコロニーからプラスミドを

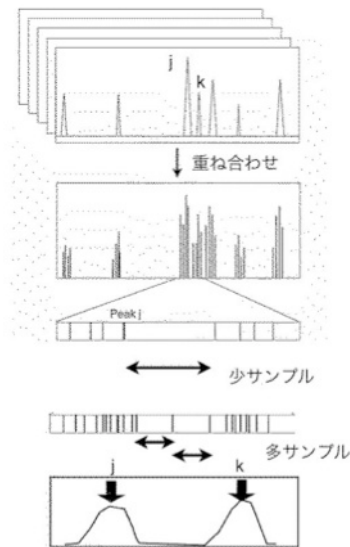


図 3 多検体アラインメントの原理

精製して塩基配列を決定した後に、菌種の推定と集計を行なうという作業から解放されるということである。また、これらのサンプルは三日間の変化を追っており、細菌叢の日内変動を把握することができた。個人の差菌叢を解析するとき日内変動は常に問題になってきた。つまり、朝食前に採取した口腔内細菌叢と就寝前に採取した細菌叢がまったく異なるのであれば、口腔内細菌叢の解析は個人の特色ととらえた解析とはなり得ないということになる。今回の 3 人の解析結果を菌の種類とそれらの割合でベクトル空間に配置し、互いの位置関係を主成分分析によってグラフに示してみた (図 4)。その結果、菌の量は変動しても、一人の細菌叢を示す点はグラフ内でまとまって存在し、別の個人の細菌叢を示す点とは異なった領域に集まることが判った。すなわち、Monte Carlo 法に基づく菌叢解析は、塩基配列解析に基づく結果と同様に個人の細菌叢を特徴づける結果を示すのに十分な機能を有することが明らかになった。

##### (3) TRFMAW の開発と公開

申請者らは制限酵素断片長と菌種との関係を求めるプログラムをすでに公開していた (Y. Nakano et al., 2006. Bioinformatics 22: 1788-1789) が、16S rRNA 遺伝子の Forward 側からの断片長しか計算に利用できなかった。今回は、複数の制限酵素で細菌 rRNA 遺伝子増幅断片を切断したときに生じる両末端断片長のデータを参照しつつ、細菌の種の同定を推定するプログラムを作成し、一般に公開した (<http://trflp.info/trfmaw/>)。各制限酵素断片から予測できる菌種のグルー

表 1 3人より得られた 36 サンプルの口腔内細菌叢の解析結果。sp1~32 が菌種、A01MY ~C04YN がサンプル名。各値は菌種が含まれる割合 (%)

Proportional abundances predicted by T-RFLP in the 36 saliva samples

Samples	Predicted species <sup>a</sup>															
	sp1	sp2	sp3	sp4	sp5	sp6	sp7	sp8	sp9	sp10	sp11	sp12	sp13	sp14	sp15	sp16
A01MY	0	0	10.41	4.11	0	0.12	0	0.51	2.59	0	3.26	0.42	0	2.93	0.15	0
A02MY	0	0	15.89	0	0	0.25	0	1.55	0	0	4.69	0	0	5.78	0.28	0
A03MY	0	0	17.99	0	0	0.11	0	0.64	3.29	0	3.9	0	0	0.93	0.38	0
A04MY	0	0	11.04	0	0	0.15	0	2.18	0	0	0	2.5	0	2.42	0.12	0
B01MY	0.74	0.29	10.21	0	0	0	0	2.86	2.6	0	1.89	0	0	0	0.24	0
B02MY	0.63	0.14	13.26	0	0	0.17	0	0.93	2.77	0	2.89	0	0	2.03	0.1	3.52
B03MY	0	0.46	16.23	0	0	0.2	0	1.54	0	0	3.39	0	0	5.24	1.06	0
B04MY	1.31	0.16	14.5	0	0	0	0	1.34	1.57	0	3.08	0.38	0	0	1	0
D01MY	6.35	0	13.48	1.41	0	0	0	0.37	0	0	0	1.41	0	0	0.16	2.66
D02MY	0	0	15.45	0	0	0.15	0	0.19	0	0	3.45	1.47	0	1.8	0	0
D03MY	0	0	16.32	4.39	0	0.22	0	0.24	0	0	4.11	0.5	0	0.21	0.23	3.29
D04MY	0	0	13.19	0	0	0	0	0	0	0	0	5.23	0	0	0.32	0
A01TT	0	0	12.4	0	2.43	0.17	0	1.06	0	0	0	0.56	8	0.82	1.66	0
A02TT	4.12	0	18.43	2.19	0	0.11	0	0.26	0	0	0	1.1	3.52	0.49	1.89	0
A03TT	5.86	0	21.19	3.03	0	0	0	0.23	0	0	0	1.83	0	0	2.2	0
A04TT	5.52	0	9.97	2.66	2.18	0.11	0	0.18	0	0	0	1.83	4.59	0.48	0.28	0
B01TT	0	0	10.33	2.8	2.49	0.15	0	0.6	0	0.13	0	0.56	9.67	1.44	0.54	0
B02TT	0	0	13.33	2.29	0	0.21	0	0.66	0	0.23	0	0.71	5.03	1.5	0.75	0
B03TT	0	0	14.67	2.46	0	0.26	0	0.37	0	0	0	1.41	6.94	0.96	0.88	0
B04TT	0	0	13.24	0	3.48	0.2	1.6	3.18	0	0	2.69	7.35	0	0.44	1.38	0
C01TT	0	0	7.75	2.5	3.28	0.1	0	1.04	0	0.21	0	0.63	8.47	0.56	0.25	0
C02TT	0	0	13.76	7.51	3.66	0.15	0	2.18	0	0	3.11	1.05	0	0.98	1.35	0
C03TT	0	0	17.74	3.07	0	0.13	0.17	0.88	0	0.23	0	2.02	0	1.72	2.02	0
C04TT	0	0	13.96	0	4.51	0.09	0	0	0	0	0	4.53	0	0	4.46	0
A01YN	0	0	8.69	0	0	0.12	0	0.17	0	0.13	5.97	1.51	0	11.54	0.77	2.4
A02YN	0	0	16.57	0	0	0.25	0	1.59	0	0	3.28	7.11	0	2.57	1.7	0
A03YN	0	0	14.37	0	0	0.16	0	3.91	0	0.36	3.72	7.22	0	2.49	1.19	0
A04YN	7.43	0	13.13	2.63	0	0.17	0	0.19	0	0.39	0	2.93	0	0.61	1.19	2.99
B01YN	9.54	0	8.95	1.99	0	0.12	0	0.16	0	0.14	0	0.56	0	2.08	0.13	0
B02YN	9.64	0	14.33	1.73	0	0.18	0	0.18	0	0.31	2.52	1.1	0	5.09	1.12	2.6
B03YN	7.18	0	13.41	2.61	0	0.12	0	0.26	0	0.29	2.77	0.96	0	2.25	0.62	2.62
B04YN	0	0	14.12	0	0	0.32	0.36	0	0	0.29	4.22	4.53	0	0	0.96	0
C01YN	8.39	1.05	10.51	2.07	0	0.08	0	0.28	0	0.12	0	0.44	0	4.29	0.08	0
C02YN	0	0	16.44	4.63	0	0.09	0	0.17	0	0.3	2.7	3.67	0	0.41	1.06	0
C03YN	0	0	22.06	6.03	0	0.11	0	0.28	0	0.32	0	0.77	0	2.08	0.83	0
C04YN	0	0	15.28	5.33	0	0.2	0	0.36	0	0.22	0	0.96	0	2.99	1.95	6.65

(continued)

Samples	Predicted species <sup>a</sup>															
	sp17	sp18	sp19	sp20	sp21	sp22	sp23	sp24	sp25	sp26	sp27	sp28	sp29	sp30	sp31	sp32
A01MY	0.21	17.12	0	1.72	21.41	0.11	0.11	0	0.15	0	0	29.57	0	2.72	2.4	0
A02MY	0.26	16.29	2.51	0	7.28	0.16	0.18	0	0	0	0	25	0	11.9	7.97	0
A03MY	0.16	18.25	0.79	0	2.99	0.2	0.27	0	0.29	0	0	36.49	0	6.73	6.24	0.34
A04MY	0.24	7.91	0	0.24	18.3	0.09	0.1	0	0	0	0	39.98	0	11.54	3.2	0
B01MY	0.33	5.91	0	0.61	10.47	0.35	0.13	0	0.41	0	0	47.12	0.37	9.16	5.86	0
B02MY	0.25	4.07	1.06	0	6.01	0.15	0.12	0	0.18	0	0	36.15	0.72	14.19	9.94	0
B03MY	0.73	3.86	0	0	5.69	1.29	0.91	0	0.38	0	0	48.26	1.46	6.58	2.27	0
B04MY	0.21	3	0.23	0	4.26	0.36	0.28	3.17	0	0	0	49.47	0.46	9.49	4.53	0
D01MY	0.24	14.3	0	2.26	3.55	0.32	0.19	0	0	3.02	1.89	32.5	0	10.68	4.96	0.26
D02MY	0.26	11.66	0	0	8.73	0	0.11	0	0	1.72	2.38	39.56	0	8.25	4.82	0
D03MY	0.09	11.6	0.32	0	2.42	0.23	0.11	0.16	0	0	0	46.34	0	5.02	3.72	0
D04MY	0.27	14.22	0	0	1.86	0.25	0.13	1.98	0	0	0	49.06	0	5.57	7.65	0
A01TT	1.63	11.22	0	8.77	17.48	2.71	1.96	0	0	1.93	2.59	18.98	0	3.13	2.36	0.13
A02TT	0.68	11.05	0	7.08	1.91	0.77	0.25	0	0	1.58	1.51	36.97	0	3.99	2.09	0
A03TT	2.25	10.63	0	7.81	3.52	0.48	0.36	0	0	1.39	2.02	26.45	0	6.24	4.53	0
A04TT	3.66	10.92	0	3.67	4.13	1.11	0.23	0	0	2.93	3.48	39.23	0	0.22	0	0.2
B01TT	3.27	13.44	0	9.08	10.24	0.52	0.39	0	0	1.28	1.95	27.72	0	2.09	1.21	0.1
B02TT	2.18	14.03	0	6.03	7.05	2.56	0.33	0	0	1.59	2.13	36.92	0	1.43	1.04	0
B03TT	3.37	13.15	0	3.48	9.87	2.69	0.53	0	0	1.87	2.56	29.26	0	0.29	1.43	0
B04TT	0.23	11.53	0	4.61	8.01	0.34	0.38	1.37	0	0	0	36.41	0	2.32	1.04	0.21
C01TT	2.52	12.27	0	8.68	11.12	0.44	0.33	0	0	2.34	1.5	33.3	0	1.51	1.06	0.12
C02TT	2.63	18.99	0	9.19	1.58	0.32	0.28	0	0	1.9	2.33	25.14	0	1.74	1.93	0.21
C03TT	0.27	18.74	0	5.74	16.38	0.13	0.15	0	0	2.64	2.5	24.87	0	0.14	0.48	0
C04TT	0.25	14.65	0	4.03	9.13	0.21	0.17	0	0	0	0	43.66	0	0.22	0.15	0
A01YN	0.12	11.55	0	3.19	19.26	0.19	0.1	0	0	1.69	1.88	24.75	0	2.72	3.26	0
A02YN	0.21	4.97	0	3.46	4.85	0.18	0.31	0	0	0	0	34.5	0	12.32	6.12	0
A03YN	0.6	0	0	3.94	3.43	2.41	0.41	0	0	0	0	49.37	0	4.66	1.77	0
A04YN	0.52	6.27	0	3	0	0.85	0.44	0	0	1.78	1.96	49.26	0	3.08	1.17	0
B01YN	0.1	10.13	0	6.52	3.5	0.21	0.17	0	0	2.03	1.73	47.44	0	3.25	1.26	0
B02YN	0.28	8.55	0	5.17	4.67	0.98	2.31	0	0	1.86	1.63	30.12	0	3.63	2.01	0
B03YN	0.39	7.06	0	4.07	4.04	2.28	0.72	0	0	2.11	3.08	39.14	0	2.57	1.42	0
B04YN	0.34	0	0	7.48	7.79	2.11	1.52	0.4	0	0	0	45.81	0	8.83	0.9	0
C01YN	0.15	10.62	0	5.88	7.95	0.16	0.17	7.08	0	1.65	2.7	41.88	0	2.6	0.93	0
C02YN	0.17	9.63	0	3.72	3.25	0.19	0.22	0	0	0	0	34.85	0	12.08	6.42	0
C03YN	0.19	6.91	0	0.91	6.78	0.26	0.2	0	0	0	0	45.06	0	4.03	3.18	0
C04YN	0.63	13.1	0	11.68	0	0.46	0.25	0	0	3.55	3.16	29.28	0	1.25	2.72	0

<sup>a</sup>Each group contains the following species: sp1—*Abiotrophia para-adiacens*; *Granulicatella adiacens*; sp2—*Actinobaculum schaalii*; sp3—*Actinomyces* sp.; sp4—*Bacillus fusiformis*; sp5—*Bacteroidales* oral clone; sp6—*Beta proteobacterium*; sp7—*Bifidobacterium* sp.; sp8—*Burkholderia* sp.; sp9—*Candida* *Megasphaera micronuciformis*; sp10—*Erysipelothrix rhusiopathiae*; sp11—*Fusobacterium* sp.; *Fusobacterium periodonticum*; sp12—*Gemella* spp.; sp13—*Granulicatella elegans*; sp14—*Haemophilus pittmaniae*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *H. parainfluenzae*, *A. segnis*; sp15—*Kocuria* sp.; sp16—*Leptotrichia* sp.; sp17—*Microbacterium* spp.; sp18—*Neisseria* sp., *N. polysaccharea*, *Bergeriella denitrificans*, *Vitreoscilla stercoraria*; sp19—*Paenibacillus laetus*; sp20—*Porphyromonas* sp.; sp21—*Prevotella* spp.; sp22—*Rothia dentocariosa*; sp23—*Rothia mucilaginosa*; sp24—*Selenomonas* sp.; sp25—*Simonsiella muelleri*; sp26—*Staphylococcus caprae*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus warneri*; sp27—*Staphylococcus epidermidis*; sp28—*Streptococcus* spp.; sp29—*Treponema* sp.; sp30—*Veillonella atypica*; sp31—*Veillonella parvula*, *Veillonella dispar*, *Veillonella* sp.; sp32—*Xanthomonas* sp.

プを拾い出せるようになった。これによって、少ない制限酵素処理でより多くの情報が得られるようになり解析処理速度が向上した。

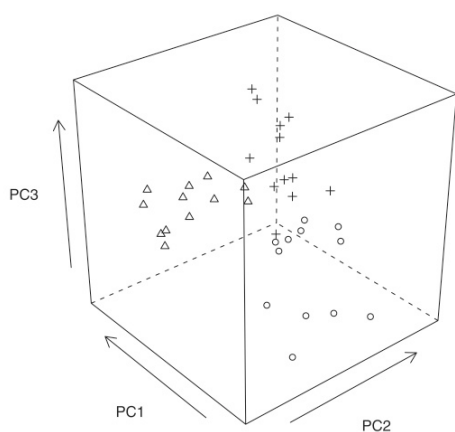


図 4 主成分分析による細菌叢の分布：○、△、+が個人を識別する記号となっている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ①T. Takeshita, N. Suzuki, Y. Nakano, M. Yasui, M. Yoneda, Y. Shimazaki, T. Hirofuji, and Y. Yamashita. 2012. Discrimination of the oral microbiota associated with high hydrogen sulfide and methyl mercaptan production. *Sci. Rep.* 2: 215. 査読有
- ②T. Takeshita, M. Yasui, M. Tomioka, Y. Nakano, Y. Shimazaki, and Y. Yamashita. 2011. Enteral tube feeding alters the oral indigenous microbiota in elderly adults. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 6739–6745. 査読有
- ③Y. Nakano, T. Takeshita, M. Yasui, and Y. Yamashita. 2010. Prediction of plausible bacterial composition based on terminal restriction fragment length polymorphisms using a Monte Carlo method. *Microb. Ecol.* 60: 365–373. 査読有
- ④T. Takeshita, N. Suzuki, Y. Nakano, Y. Shimazaki, M. Yoneda, T. Hirofuji, and Y. Yamashita. 2010. Relationship between oral malodor and the global composition of indigenous bacterial populations in saliva. *Appl. Environ. Microbiol.* 3: 2806–2814. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ①鈴木奈央, 中野善夫, 畑野優子, 米田雅裕, 横瀬勝美, 桑田文幸, 廣藤卓雄. 塩化亜鉛溶

液を用いた洗口による口腔常在フローラの変化, 日本歯科保存学会 2011 年度秋季学術大会 (第 135 回) 2011 年 10 月 20 日大阪億再交流センター (大阪府)

②竹下徹, 鈴木奈央, 中野善夫, 米田雅裕, 廣藤卓雄, 山下喜久. 硫化水素およびメチルメルカプタン高産生口腔異常フローラの細菌構成. 第 53 回歯科基礎医学会 2011 年 10 月 1 日長良川国際会議場 (岐阜県)

③鈴木奈央, 中野善夫, 畑野優子, 米田雅裕, 横瀬勝美, 桑田文幸, 廣藤卓雄. 塩化亜鉛溶液を用いた洗口による口腔内細菌叢の変化の解析. 第 52 回歯科基礎医学会 2010 年 9 月 21 日タワーホール船堀 (東京都)

④中野善夫: 口腔内細菌叢解析による口臭予測, 第 43 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会. 2010 年 1 月 21 日日本大学歯学部 (東京都)

[その他]

ホームページ等

<http://trf-alignment.appspot.com>

<http://trflp.info/trfmaw/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 善夫 (NAKANO YOSHIO)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号: 80253459