

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月15日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792517

研究課題名（和文） 健康評価の指針となる口腔常在フローラの探索

研究課題名（英文） Structure of oral indigenous microbiota for evaluation of oral health

研究代表者

竹下 徹（TAKESHITA TORU）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：50546471

研究成果の概要（和文）：

本研究により、健康な口腔を保ってきた高齢者の口腔常在フローラが特徴的な構成を呈しており、特に *Neisseria* が通常の歯科医院受診者に比べて高比率存在していることが明らかとなった。*Neisseria* 属の菌種が他の細菌もしくは宿主へのなんらかのインタラクションを介して口腔の健康維持に関わっている可能性が考えられる。本菌が口腔疾患の予防法を考えるうえで新たなターゲットになりうることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This investigation revealed that salivary bacterial population of the elderly with healthy oral condition exhibited characteristic composition. *Neisseria* species were characteristically predominant in their microbiota compared with the patients visiting dental offices. Interaction of *Neisseria* with other commensal bacteria or host might be involved with maintenance of oral health. This result suggests that *Neisseria* would be a target for a new prevention approach of oral diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：予防歯科学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：口腔常在フローラ、16S rRNA、次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

ヒトの体内では様々な部位において、微生物が複雑な相互作用に基づく常在細菌叢（フローラ）を構築し生息している。常在フローラの構成は個体間で異なり、この個体差と宿主の健康状態との関連が近年数多く指摘され注目を集めている。特に腸内フローラにおいては早くから研究が進められており、実際の臨床においても炎症性腸疾患などにおいてプロバイオティクスのような常在フロ

ーラ構成の改善を目指した治療法が導入されている。

口腔も多種多数の細菌が共生する一つの微生物生態系である。齲蝕や歯周疾患に代表される口腔感染症については数種の病原性細菌が同定されているが、これらの細菌も通常生態系の一員として口腔に共生している。したがって疾患の発症においてはとりまく他の常在細菌との相互作用が大きな役割を担っているものと推測される。これまで口腔疾患の

予防、治療においては、直接疾患を引き起こす病原細菌の除去が目標とされてきたが、病原細菌が繁榮しにくい常在フローラへの誘導というのも口腔疾患予防における一つの新たなアプローチになりうると考えられる。

このような予防法がこれまで十分に検討されてこなかった原因として、複雑な細菌群集の構成の把握が技術的にきわめて困難であったということが挙げられる。従来の培養を介した手法では、フローラ全体の構成の解析に膨大な時間と労力を要するだけでなく、培養条件が厳しいものは見落としてしまうという問題があった。しかしながら、近年細菌群集から直接抽出した DNA の 16S rRNA 遺伝子領域を解析する手法が開発されたことにより、比較的容易にそれらを含めた全体像を知ることが可能になった。我々はこのような 16S rRNA 遺伝子を利用した解析法のなかでもより迅速かつ簡便に口腔フローラの構成パターンを把握する事ができる Terminal restriction fragment polymorphism (T-RFLP) 法を用い大規模集団における比較解析を行う事で、口腔内の常在細菌のバランスが歯周疾患、口臭といった口腔の健康状態、さらには施設入所高齢者での肺炎の発症率といった全身状態とも関連していることを明らかにし、これまでに研究論文として報告している。

常在フローラのバランス管理に焦点をあてた新たな口腔疾患予防アプローチを具体化していくうえで、治療の目標となる「健康な口腔フローラ」の構成を詳細に定義する必要がある。我々はこの対象として、「特別な口腔管理を行っていないにも関わらず健康な口腔を保つことができる高齢者」に注目した。う蝕と歯周病はほとんど全ての人が罹患すると言ってもいい国民病であり、多くの場合徹底したプラークコントロールを行わなければ加齢とともに歯を失っていく。自己管理のみで健康な歯を保ってきた人の口腔には病原性細菌の繁榮にとって不都合な、本当の意味での「健康な常在フローラ」が構築されている可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では健康な口腔を維持している高齢者から口腔細菌群集検体を採取し、16S rRNA 遺伝子を利用した網羅的細菌群集解析法を用いてその細菌構成の解明を目指した。我々が従来使用していた T-RFLP 法に加え、一度に膨大な数の塩基配列を解読する事が可能な次世代シーケンサーを用いた解析により詳細な細菌種の同定を行った。

3. 研究の方法

1. 被験者の選定と検体の採取

鳥取県歯科医師会は 8020 運動の一環とし

て「鳥取県高齢者よい歯のコンクール」を行っている。これは鳥取県内に住む 65 歳以上で歯と口の中の状態がよく自分の歯が 20 歯以上残っている高齢者を毎年 11 月に表彰するものである。応募者は 6 月 1 日から 8 月 31 日の間に最寄りの歯科医院で予備審査を、さらに 9 月に各地区の市町村保健センターで地区審査を受けたのち、最終的に県での審査によって当年度の受賞者が選考される。この応募者に対して審査の際に本研究に対する説明を行い同意取得したのち、16 名について唾液の採取を行った。5 分間パラフィンワックスを咀嚼してもらい得られた刺激唾液を用いた。さらに、同県米子市の歯科医院において受診した患者 43 名から歯周組織検査終了後唾液を採取した。

2. 唾液中細菌構成の解析

1) T-RFLP 法

唾液検体は 16,000G で遠心した後、沈殿について 90°C で 10 分間加熱後、ジルコニアビーズで破碎し、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール法とエタノール沈殿を用いて DNA を抽出した。得られた DNA について 6-carboxyfluorescein (6-FAM) で蛍光標識された細菌に共通な配列であるプライマー 8F (5' - AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG -3') と hexachloro-6-carboxyfluorescein (HEX) で標識された細菌共通配列であるプライマー 806R (5' - GGA CTA CCR GGG TAT CTA A -3') を用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅した。16S rRNA 遺伝子断片群は、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製した後制限酵素 HaeIII で切断し、キャピラリー電気泳動を行い、細菌構成を菌種と菌量を反映したピークパターンとして表した。得られた T-RFLP ピークパターンは誤差を考慮して分子量 150 以内に存在するピークは同一と見なしアラインメントを行った後、検体同士の類似度関係について考察を行った。類似度は Bray-Curtis Dissimilarity index を用いて評価した。

2) Barcoded pyrosequencing 法

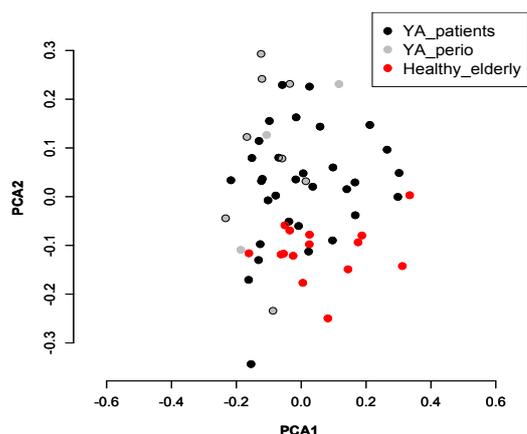
健康高齢者 16 名と歯科医院の患者のうち歯周炎が重篤な者 8 名の計 24 名の唾液 DNA 検体については Ion Personal Genome Machine (PGM, Life technologies 社) を使用し 16S rRNA 遺伝子 Barcode pyrosequencing 法を用いて構成の詳細な比較を行った。DNA 検体はそれぞれ 6 塩基のタグ配列の異なるアダプター配列 A (5' - CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG-3') のついた細菌共通配列プライマー 8F とアダプター trp1 配列 (5' - CCT CTC TAT GGG CAG TCG GTG AT -3') のついた細菌共通配列プライマー 338R (5' - TGC TGC CTC CCG TAG GAG T -3') を用い増幅した。各増幅断片は精製後、等濃度に調整し混

合したのち、26 pM に調整し Ion PGM Template OT2 400 kit (Life technology 社)を用いてエマルジョン PCR を行った。各ビーズは濃縮後 Ion 314 chip にアプライし、Ion PGM Sequencing 400 kit を用いて塩基配列解読を行った。得られた塩基配列は、CLC Genomics Workbench (CLC Bio) においてトリミングを行った後、R および PHP で作成したスクリプトにより、280 塩基以下のもの、8F プライマーが含まれていないもの、7 塩基を超えるホモポリマー配列を含むものを除外し、タグ配列により各検体に振り分けた。以上のクオリティチェックにパスした塩基配列は UCLUST を用いて 97% 以上相同であるものを同一 Operational taxonomic unit (OTU) とみなしグループ化し、Chimera slayer を用いてキメラ配列を除外した。各 OTU の代表配列については PyNAST を用いアラインメントを行い、各検体間の類似度 UniFrac を算出した。各検体間の類似度関係は主座標分析を行い、第一、第二主座標得点を基に描画した。また、各代表配列の由来を RDP classifier を用いて検索した。Minimum support threshold は 60% 以上とした。

4. 研究成果

1. T-RFLP 解析における菌叢構成の比較

健康高齢者 16 名の唾液中の細菌構成は T-RFLP 解析を行いピークパターンとして表した後、米子市の歯科医院を受診した患者 43 名と比較を行った結果を図 1 に示す。健康高齢者 (赤) は第二主成分の負の方向に偏って存在しており、歯科医院を受診した一般の被験者とは異なった細菌構成になっていることが示唆された。歯科医院受診者のなかでも重篤な歯周炎患者は特に第二主成分正の方向に偏っており、健康高齢者の口腔細菌叢と



は大きく異なっていた。
図 1 T-RFLP ピークパターンの主成分分析 Healthy_elderly (n = 16), 健康高齢者; YA_patients, 歯科医院受診者 (n = 32); YA_perio, 歯科医院受診者のうち歯周炎が重篤な者 (n = 11)

T-RFLP ピークパターンの中で第二主成分負の方向に高い因子付加量は断片サイズ 65043 のピークであり (図 2)、このピークはそのサイズから *Neisseria* 属および *Haemophilus* 属の菌種に相当する。このことから健康高齢者では *Neisseria*, *Haemophilus* 属の菌種が高比率で存在することが示唆された。一方第二主成分負の方向には断片サイズ 66732 および 83262 のピークが強い影響を示した (図 2)。これらのピークはそのサイズから *Prevotella* 属、*Veillonella* 属の菌種に相当した。

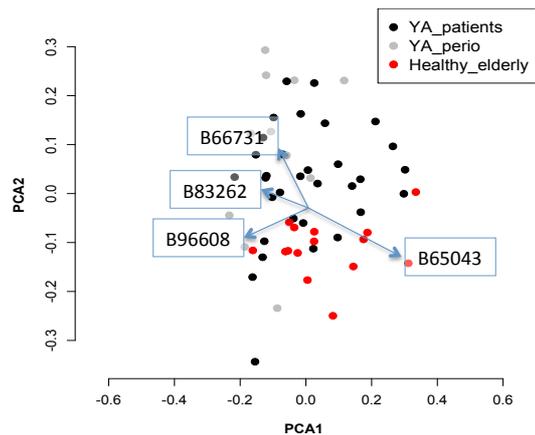


図 2 第一、第二主成分方向に高い因子付加量を示すピーク 矢印の大きさは因子付加量を示す

2. Barcoded pyrosequencing 解析における菌叢構成の比較

健康高齢者 16 名と歯科医院受診者のうち歯周炎が重篤な者 8 名については次世代シーケンサー Ion PGM を用いた Barcoded Pyrosequencing 解析を行った。平均リード超 221 bp、490, 224 リードの配列が得られ、そのうちクオリティチェックを通過した 166, 152 リードを分析に使用した。バーコード配列に基づいて結果平均 6923 リードが各検体に振り分けられた。(表 1)

表 1 各検体のリード数

Primer	リード数		
T601 acagtg	5769	T616 atacag	10194
T602 acatgt	5352	T617 atagtc	5928
T603 acgatc	5063	T618 atcatg	8030
T604 acgcat	6242	T619 atcgac	6595
T605 acgtcg	4986	T620 atctat	7520
T606 actact	4787	T622 atgtct	7922
T607 actcgc	4787	T623 cacgct	7835
T609 agactc	7924	T624 cactcg	11614
T611 agcagc	4527	T626 cagctc	7193
T613 agtagc	9100	T627 cagtgc	6752
T614 agtcgt	6855	T629 catcat	5305
T615 agtgag	8168	T630 catgtc	7704

Uclust を用いて 97%以上の相同性を示すものを同一の菌種 (OTU) とみなすと 10,763OTU が検出された。検出 OTU 数、Shannon index、といった α -diversity 指標はいずれも健康高齢者群で低く健康高齢者の細菌叢のほうがシンプルであることが示唆されるものの有意な差は認められなかった。24 検体間の類似度関係を検出菌種の系統学的距離も考慮にいた細菌群集類似度指標 UniFrac を用いて評価し主座標分析を行った結果を図 3 に示す。Barcoded pyrosequencing 法を用いた解析においても両集団の偏りは認められた。

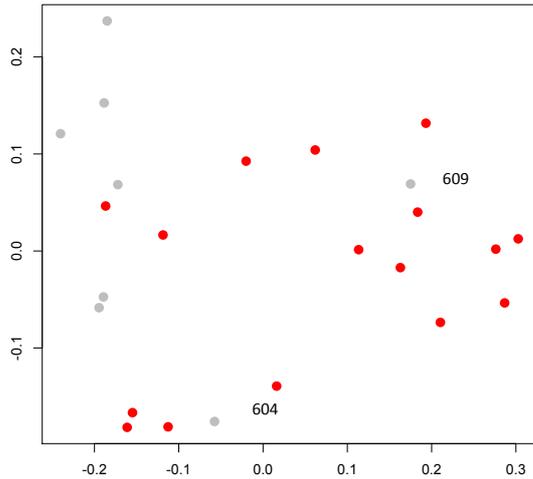


図 3 Unweighted UniFrac に基づいた主座標プロット 赤、健康高齢者；灰、重篤歯周炎患者

菌門レベルでは健康高齢者においても一般の被験者同様 11 門が検出された。そのうち Firmicutes、Actinobacteria、Proteobacteria、Bacteroidetes の 4 菌門が大勢を占めており、加えて TM7、SR1、などが検出された。なかでも Proteobacteria と Cyanobacteria に両群で有意な差が認められた。特に Proteobacteria は健康高齢者では有意に高比率存在していた。(図 4)

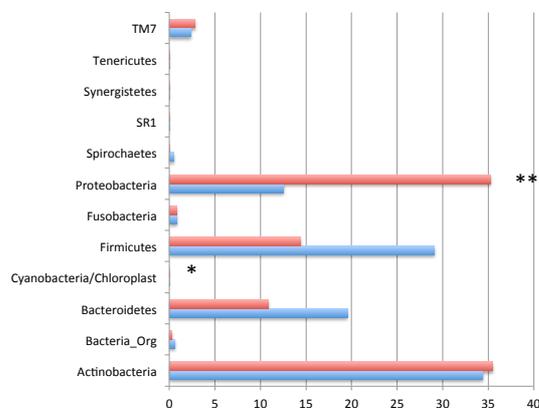
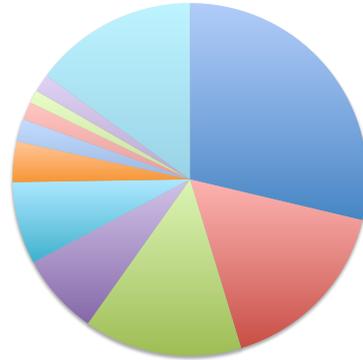


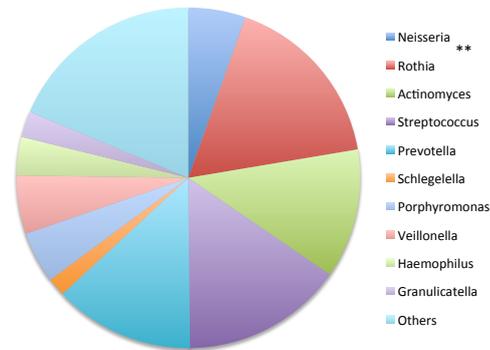
図 4 各菌門の構成比率 赤、健康高齢者；青、歯周炎患者

菌属レベルでは 89 属が検出されどちらかの群においてのみ特徴的に検出される菌種は存在しなかった。優勢な菌種についても両群において共通しており、*Neisseria*、*Rothia*、

Healthy elderly



Perio



Actinomyces, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Schlegelella*, *Porphyromonas*, *Veillonella*, *Haemophilus*, *Granulicatella* などであった (図 5)。一方で、構成比率分布は異なっており、特に *Neisseria* は重篤歯周炎患者においては $5.4 \pm 6.5\%$ であるのに対し健康高齢者においては $28.7 \pm 20.1\%$ と非常に高比率検出された。その他にも存在比率は低いものの *Bergeriella*, *Ottowia* 属が健康高齢者で *Streptophyta* 属が重篤歯周炎患者で有意に高比率認められた。

本研究により、健康な歯を保ってきた高齢者では口腔の細菌構成が異なっており、特に *Neisseria* 属の菌種の構成比率が高いことが明らかになった。単に *Neisseria* にとって健康な口腔が生育しやすい環境である可能性もあるとはいえ、*Neisseria* が他の細菌もしくは宿主へのインタラクションを介して口腔の健康維持に関わっている可能性も十分に考えられる。本研究によって *Neisseria* および口腔常在フローラの口腔の健康への関連性が示唆された。

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)

① Takeshita T, Yasui M, Tomioka M, Yamashita Y. Enteral Tube Feeding Alters the Oral Indigenous Microbiota in Elderly Adults. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77: 6739-6745, 査読あり

② Takeshita T, Suzuki N, Nakano Y, Yasui M, Yoneda M, Shimazaki Y, Hirofuji T, Yamashita Y. Discrimination of the oral microbiota associated with high hydrogen sulfide and methyl mercaptan production. *Scientific Reports*, 2012, 2: 215, 査読あり

③ Li H, Takeshita T, Furuta M, Tomioka M, Shibata Y, Makimura K, Yamashita Y. Molecular characterization of fungal populations on the tongue dorsum of institutionalized elderly adults. *Oral Diseases*, 2012, 18: 771-777, 査読あり

④ Yamanaka W, Takeshita T, Shibata Y, Matsuo K, Eshima N, Yokoyama T, Yamashita Y. Compositional stability of a salivary bacterial population against supragingival microbiota shift following periodontal therapy. *PLoS One*, 2012, 7: e42086, 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

① 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常在フローラの細菌構成 第53回歯科基礎医学会学術大会・総会 2011年10月1日、岐阜市

② 竹下徹 口腔フローラの常在細菌構成バランスは口腔の健康状態と関連する 第53回歯科基礎医学会学術大会・総会、2011年10月2日、岐阜市

③ J. Obata, T. Takeshita, M. Unemori, Y. Shibata, A. Akamine, Y. Yamashita. Molecular analysis of bacterial community inhabiting in carious dentin 第59回国際歯科研究学会日本部会(JADR)総会・学術大会、2011年10月8日、広島市

④ Y. Yamashita, W. Yamanaka, T. Takeshita, K. Matsuo, T. Yokoyama. Bacterial composition in saliva and its connection

to oral biofilms *Eurobiofilms 2011* 2011年7月7日 Copenhagen, Denmark

⑤ 竹下徹、山中渉、松尾和樹、柴田幸江、江島信興、山下喜久 歯周治療に伴う歯肉縁上ブランクおよび唾液の細菌構成変化の比較 第61回日本口腔衛生学会・総会 2012年05月26日～2012年05月28日、横須賀市

⑥ T. Takeshita, M. Yasui, Y. Saeki, Y. Shibata, Y. Yamashita. Bacterial community succession on a hydroxyapatite disk in oral cavity in caries-active and caries-free subjects. International symposium of Microbial Ecology 13 2012年8月19日～2012年8月24日、Copenhagen, Denmark

⑦ Y. Yamashita, T. Takeshita, M. Yasui, Y. Saeki, Y. Shibata, H. Ito. Structural Shift of microbiota in dental plaque formed on a hydroxyapatite disk surface in vivo 6th ASM Conference on Biofilms 2012年9月29日～2012年10月3日、Miami, United States

⑧ 竹下徹、柴田幸江、山下喜久 う蝕経験のない成人の口腔常在フローラの細菌構成 第86回日本細菌学会総会 2013年03月18日～2013年03月21日、千葉市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹下 徹 (TAKESHITA TORU)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号：50546471