

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24406035

研究課題名(和文)細菌学的・疫学的手法を用いたアフリカ・モロッコ王国における侵襲性歯周炎の病因解析

研究課題名(英文) Microbial and epidemiological study of aggressive periodontal disease in Moroccan adolescence.

研究代表者

安細 敏弘 (ANSAI, TOSHIHIRO)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80244789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,200,000円

研究成果の概要(和文)：侵襲性歯周炎は若年者に特異的に発症する歯周炎であるが、発症に関して環境要因としての栄養摂取状況、遺伝学的要因などを包括的に解明した研究はない。本研究では疫学調査ならびに遺伝学的調査を行うことによりその環境要因を解明することにした。疫学的調査ではモロッコ王立大学の1年生を対象に、口腔内診査、唾液・歯肉縁下プラークの採取、採血、質問紙調査(年齢、性別、社会経済的背景、現病歴、既往歴、服薬情報、喫煙習慣、保健行動、食事内容(BDHQに準じる)とした。遺伝学的研究では侵襲性歯周炎が疑われる歯肉縁下プラークのA. a J P2株の有無、血球ミトコンドリアDNAの塩基配列を用いた分子人類学的解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Aggressive periodontitis are specifically involved in adolescence. However, there are no comprehensive studies which clarified the environmental and genetic factors in regard to aggressive periodontitis. This epidemiological study analyzed oral status, and properties of the patients using by questionnaire (e.g. age, sex, socioeconomic status, nutrition, and so on...). In genetic studies, we analyzed the existence of *A. actinomycetemcomitans* JP2 in subgingival plaque and molecular anthropological studies using by mitochondrial DNA sequences from blood cells.

研究分野：予防歯科学

キーワード：Aa菌 若年性歯周病 海外疫学調査

1. 研究開始当初の背景

侵襲性歯周炎の原因細菌として *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* が知られているが、その病因ならびに進行メカニズムについて不明な点が多い。このたび、侵襲性歯周炎の罹患率が高いアフリカ地区の中でモロッコ王立大学歯学部 (Dental Faculty, Mohammed V Souissi University) の Ennibi 教授と共同研究する機会を得ることができ、本調査研究をスタートした。

2. 研究の目的

侵襲性歯周炎は若年者に特異的に発症する歯周炎であるが、発症に関して、侵襲性歯周炎患者の環境要因としての栄養摂取状況、遺伝学的要因などを包括的に解明した研究はない。そこで今回、疫学調査ならびに遺伝学的調査を行うことによりその環境要因を解明することにした。

3. 研究の方法

1) 臨床サンプルを用いた遺伝学的解析

A. actinomycetemcomitans JP2 株の定量検出系の開発

これまで九州歯科大学保健医療フロンティア科学分野で行ってきたリアルタイム PCR 法を改良した口腔細菌の定量検出の技術を用いて、*A. actinomycetemcomitans* JP2 株の定量検出系に用いる。*A. actinomycetemcomitans* JP2 株のリアルタイム PCR 法による定量検出は技術上非常に困難で、未だ開発されていない経緯がある。現在開発中の技術であるので詳細な原理を記載することができないが、我々のグループにより開発の目的が立ったため、本研究計画で用いる予定である。

臨床サンプルの採取

モロッコ王国の Mohammed V Souissi University 大学 1 年生 2,000 名を対象とし、歯肉縁下プラークおよび唾液の採取を行い遺伝学的解析に使用する。また、採血を行い、血球を用いた遺伝学的解析を行う。

採取した臨床サンプルからの *A. actinomycetemcomitans* JP2 株の定量上記調査研究にて採取された歯肉縁下プラークから *A. actinomycetemcomitans* JP2 の有無について、分子遺伝学的解析を行う。

血球を用いた分子人類学的解析

血球に含まれるミトコンドリアからミトコンドリア DNA を単離し、分子人類学的クラスター分類と侵襲性歯周炎の有無について解析する。

2) フィールド調査

対象はモロッコ王立大学の 1 年次生とした。調査期間は平成 25 年秋から平成 27 年 3 月とした。

調査項目は歯・歯周組織をはじめとする口腔内診査、唾液・歯肉縁下プラークの採取、採決、質問紙調査 (年齢、性別、社会経済的背景、現病歴、既往歴、服薬情報、喫煙習慣、

保健行動、食事内容 (BDHQ に準じた内容) とした。

4. 研究成果

1) これまで九州歯科大学地域健康開発歯学分野で行ってきた口腔細菌の定量検出の技術を用いて、qPCR (リアルタイム PCR) 法を改良した方法により *A. actinomycetemcomitans* JP2 株の定量検出系を開発した。侵襲性歯周炎の病原細菌として注目されている *A. actinomycetemcomitans* JP2 株の qPCR 法による定量検出は、同細菌の遺伝学的特性ならびに技術上非常に困難で、これまで開発できなかった経緯があるが、今回われわれの研究グループで同細菌の定量検出系を世界に先駆けて開発することに成功した。また、*A. actinomycetemcomitans* の非 JP2 株に特異的な定量検出系も開発し、これらの定量検出系の開発により *A. actinomycetemcomitans* の JP2 株と非 JP2 株を区別して定量検出することが可能になった。これらの検出系を用いて、実際のモロッコの侵襲性歯周炎患者より採取した歯肉縁下プラークを用いて解析したところ、臨床サンプルでも問題なく使用可能であることが明らかになった。そこで、これらの検出系およびモロッコ Dental Faculty, Mohammed V Souissi University を受診した、侵襲性歯周炎の患者 11 名 (年齢平均 ± 標準偏差 : 26.6 ± 4.1 、16-31 歳) より採取した歯肉縁下プラークを用いて、それらの菌数を解析し、クリニカルアタッチメントレベル (CAL) との関連について解析した。歯肉縁下プラーク 88 サンプルを解析したところ、46 サンプル (52.3%) が JP2 陽性、中でも 9 サンプル (10.2%) が JP2 株と非 JP2 株の両方が陽性であった。これらのサンプルについて、 $CAL \leq 6$ mm ($n=31$) と $CAL \geq 7$ mm ($n=57$) の群に分けて JP2 株および非 JP2 株の菌数について解析したところ、 $CAL \geq 7$ mm の群の JP2 株菌数が有意に多いことが明らかになった ($P < 0.01$)。本定量系で作製した *A. actinomycetemcomitans* JP2 株と非 JP2 株特異プライマーは JP2 株と非 JP2 株を選択的に増幅し、qPCR 法を用いることによりそれぞれの菌株を特異的に定量することが可能になった。これらの検出系は *A. actinomycetemcomitans* JP2 株による侵襲性歯周炎の診断に使用可能であることが示唆された。

2) 2013 年より Mohammed V Souissi University の大学 1 年生を対象とした調査研究を開始した。内容は質問紙による口腔および全身状態の調査。栄養摂取状況の調査。口腔内診査および歯垢、唾液の採取および血液採取である。2015 年 3 月時点で約 813 名が本疫学調査に参加し、約半数が採血に同意している。本調査は現在も続行中であり、2015 年

度内に 2,000 名の口腔内診査および質問紙によるデータ採取、生体サンプルを採取予定である。

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 3件)

1. Yoshida, A., Ennibi, O-K., Miyazaki, H., Hoshino, T., Hayashida, H., Nishihara, T., Awano, S. and Ansai, T.: Quantitative discrimination of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* highly leukotoxic JP2 clone form non-JP2 clones in diagnosis of aggressive periodontitis. BMC Infect. Dis.12: 253, 2012. doi: 10.1186/1471-2334-12-253.

2. Yasunaga, A., Yoshida, A., Morikawa, K., Maki, K., Nakamura, S., Soh, I., Awano, S. and Ansai, T.: Monitoring the prevalence of viable and dead cariogenic bacteria in oral specimens and in vitro biofilms by qPCR combined with propidium monoazide. BMC Microbiol. 13: 157, 2013. et al. doi: 10.1186/1417-2180-13-157.

3. Yoshida, A., Niki, M., Yamamoto, Y., Yasunaga, A. and Ansai, T.: Proteome analysis identifies the Dpr protein of *Streptococcus mutans* as an important factor in the presence of early Streptococcal colonizers of tooth surfaces. PLoS ONE. 10:e0121176. doi: 10.1371/journal.pone.0121176.

[学会発表](計 3件)

1. 吉田明弘、宮崎秀夫、林田秀明、粟野秀慈、安細敏弘 :

Aggregatibacter actinomycetemcomitans ロイコトキシン産生/非産生株の選択的定量検出法の開発. 第 61 回日本口腔衛生学会総会 平成 24 年 5 月 25 日~27 日、神奈川歯科大学.

2. 吉田明弘、安永 愛、安細敏弘 : 第 62 回日本口腔衛生学会総会 平成 25 年 5 月 15 日~16 日、松本.

3. 中村 卓、星野倫範、吉田明弘、藤原 卓、安細敏弘 :

Streptococcus anginosus C-S lyase による組織障害性の解析. 第 66 回日本細菌学会九州地方会総会 平成 25 年 9 月 6 日、長崎.

[図書](計 3件)

1. Yoshida, A. and Ansai, T.: DHEAS and periodontal status in older Japanese. In: DHEA in Human Health and Aging. (ed. Ronald R. Watson). CRC Press, Taylor & Francis Group LLC., 263-276, 2012.

2. Yoshida, A. and Ansai, T.: Microbiological Diagnosis for Periodontal Diseases. In: Periodontal Diseases - A Clinician's Guide (Ed. by Jane Manakil), InTech, 55-66, 2012.

3. Yoshida, A., Niki, M., Ansai, T. and Nakayama, K.: Oral disease and hydrogen sulfide production by oral bacteria (eds. Derin Adebayo and Aramide Okafor), Nova Science Publishers, New York, USA, 131-145, 2013.

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www2.kyu-dent.ac.jp/dept/oral-health/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安細敏弘 (ANSAI TOSHIHIRO)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 80244789

(2) 研究分担者

宮崎秀夫 (MIYAZAKI HIDEO)

新潟大学・歯学部・教授

研究者番号: 00157629

吉田明弘 (YOSHIDA AKIHIRO)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 20364151

山下喜久 (YAMASHITA YOSHIHISA)

九州大学・歯学部・教授

研究者番号: 20192403

邵 仁浩 (SOH INHO)
九州歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：10285463

粟野秀慈 (AWANO SHUJI)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：20301442

(3)連携研究者
なし