

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293439

研究課題名(和文) 口腔バイオフィルムのメタボローム解析：細菌叢代謝活性から探る口腔疾患リスク指標

研究課題名(英文) Metabolome analysis of oral biofilm: a possible risk assessment of oral diseases using oral microbiome metabolism

研究代表者

高橋 信博 (TAKAHASHI, Nobuhiro)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：60183852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、メタボローム解析と代謝活性測定によって口腔バイオフィルムの代謝の全容を捉え、それを評価することで口腔疾患のリスク指標となる可能性を探ることを目的とした。CE-MSメタボローム解析システムによって糖・アミノ酸関連代謝物の包括的分析が可能となり、口腔バイオフィルムの糖・アミノ酸代謝の全容が明らかになった。また、alamarblue代謝活性測定システムによって、微量の試料の代謝活性が定量可能となった。さらに、バイオフィルムの採取部位および代謝基質によって代謝活性は異なった。これら口腔バイオフィルムの代謝の性質を比較することで、口腔疾患リスクや健全度を評価可能であると推察された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the whole picture of metabolic systems of oral biofilm through the metabolome analysis and metabolic activity measurement, and to consider an assessment of oral health and disease using oral microbiome metabolism. The CE-MS metabolome system enabled to analyze the metabolites associated with carbohydrates and amino acids comprehensively and revealed the whole picture of metabolic systems of carbohydrates and amino acids in the oral biofilm. In addition, the metabolic activity of a tiny amount of oral biofilm was successfully measured using the alamarblue system. Furthermore, the metabolic activity was diverse among sample sites and metabolic substrates, suggesting that these metabolic characteristics of oral microbiome can be used as an indicator of oral health and disease.

研究分野：口腔生化学

キーワード：口腔バイオフィルム メタボローム 口腔マイクロバイオーム 糖代謝 アミノ酸代謝

1. 研究開始当初の背景

21世紀の国民の健康維持・増進を定めた「健康増進法」に「歯の健康の保持」が明記された。その達成のためには、齲蝕、歯周疾患、口臭といった「口腔バイオフィルム性疾患」の生涯にわたる予防が不可欠である。

口腔バイオフィルム研究は、構成細菌叢の解析が先行し、500種を超す多様な細菌、すなわち「何がいるのか？」を明らかにしてきた。引き続き行われた詳細な研究から、齲蝕や歯周疾患は特定の細菌で発症するのではなく、種々の細菌群が段階的に関与することが明らかになってきた。これら一連の研究は、特定の細菌を病原菌と捉える「特異的プラーク説」から、口腔バイオフィルム構成細菌叢の変遷に伴い「疾患発症プロセス」が進行すると捉える「生態学的プラーク説」へと、「パラダイムの転換」をもたらしつつある。

この「疾患発症プロセス」を進行させる駆動力は、細菌叢を構成する細菌の持つ酸、アンモニア、硫化物等を産生する代謝活性、すなわち「何をしているのか？」であると考えられる。齲蝕や歯周疾患に関連する個々の細菌の代謝は、*in vitro*において詳細に研究されてきたが、*in vivo*における口腔バイオフィルム全体の細菌叢の代謝研究は、代表者らによって緒に就いたばかりである。「疾患発症プロセス」をモニターし、リスク評価を行うためには、口腔バイオフィルム細菌叢の代謝の全容を知ることが不可欠と考えられる。

代謝関連物質の網羅的解析を「メタボローム解析」という。代表者らは口腔バイオフィルムの糖代謝メタボローム解析を世界に先駆けて行ってきた。しかし、これまでの解析は糖代謝に限られ、もう一つの重要な代謝であるアミノ酸代謝については、各種アミノ酸の存在分析はなされているものの、それらの代謝系については不明であった。

2. 研究の目的

口腔バイオフィルムの糖代謝がう蝕のリスク指標となるように、口腔バイオフィルムのアミノ酸代謝は、アンモニア産生による酸の中和を介した石灰化の促進、アンモニア・硫化水素といった歯周組織傷害物質の産生による歯周疾患の惹起、短鎖脂肪酸の産生による口臭の発症などと関連しており、これら口腔疾患のリスク指標となることが考えられる。そこで本研究では、次の事項を目的とした。

(1) 最新のCE-MSメタボローム解析システム、及び、微量サンプルでも代謝活性を測定することが可能な alamarblue 代謝活性測定システムを構築し、口腔バイオフィルムのメタボローム解析(糖・アミノ酸代謝関連物質の網羅的解析)および代謝活性測定によって、口腔バイオフィルム細菌叢全体の代謝の詳細を明らかにする。

(2) メタボロームおよび代謝活性解析結果と口腔臨床指標の比較から、口腔バイオフィルム細菌叢全体の代謝を基盤とした新たな「口腔疾患リスク指標」の可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) CE-MS メタボローム解析システムによる代謝測定

CE-TOFMSはAgilent Technologies (Waldbronn, Germany) のものを、測定に要する泳動用 buffer、シース液、キャピラリーカラムなどは Human Metabolome Technologies (HMT) 社(鶴岡) のものを用いた。

アミノ酸代謝の主要な代謝中間体および代謝産物と想定される化合物の標品を手し、CE-TOFMSの分析条件を決定した。これまでに確立した口腔バイオフィルム採取法・前処理法にて、試料を採取・調整後、CE-TOFMSにて分析した。

メタボローム・プロファイルの解析には、Agilent Technologies 社の専用のソフトウェア(MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis)を用いた。

(2) alamarblue 代謝活性測定システムによる代謝測定

上記と同様に調整した口腔バイオフィルム試料に alamarblue を加えた後、蛍光分光光度計を用い、励起波長 535 nm、蛍光波長 590 nm、35°C で、蛍光強度をモニターした。

(3) メタボロームおよび代謝活性解析結果と口腔臨床指標の検討

口腔バイオフィルム細菌叢全体の代謝を基盤とした新たな「口腔疾患リスク指標」の可能性について検討した。

4. 研究成果

(1) 微量の口腔バイオフィルム試料を用いた CE-MS メタボローム解析システムの確立

代謝関連物質同定アルゴリズムの改良によって、口腔バイオフィルムにおける糖およびアミノ酸代謝の包括的分析ならびに代謝阻害剤の影響を、精度良く解析できるようになった。これらの結果を集約することで、口腔バイオフィルムの糖・アミノ酸代謝の全容が明らかになった。

(2) 微量の口腔バイオフィルム試料を用いた alamarblue 代謝活性測定システムの構築

代謝の際に産生される還元力を検出できる alamarBlue を口腔バイオフィルムに負荷し、その蛍光強度をモニターすることで、微量の口腔バイオフィルムの代謝活性を定量することが可能となった。

(3) 各種バイオフィルムの代謝比較

各種バイオフィルムの代謝活性を測定・比較したところ、バイオフィルムの種類（採取部位）および代謝基質によって代謝活性は大きく異なることが明らかになり、代謝活性やその性質を比較することで、口腔疾患のリスクや健全度を評価することが可能であると推察された。

さらに、メタボローム解析によって、代謝活性のもととなる代謝経路を推定できるようになり、口腔バイオフィルム全体の代謝活性および代謝経路から、個々の口腔バイオフィルムの質や機能を評価することが可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 19 件)

1. Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Takahashi N. pH response and tooth surface solubility at the tooth/bacteria interface. *Caries Res.* 2017;51(2):160-166. doi: 10.1159/000454781.
2. Takahashi N, Nyvad B. Ecological hypothesis of dentin and root caries. *Caries Res.* 2016;50(4):422-431. doi: 10.1159/000447309.
3. Washio J, Takahashi N. Metabolomic Studies of oral biofilm, oral cancer, and beyond. *Int J Mol Sci.* 2016 Jun 2;17(6). pii: E870. doi: 10.3390/ijms17060870.
4. Kawashita M, Endo N, Watanabe T, Miyazaki T, Furuya M, Yokota K, Abiko Y, Kanetaka H, Takahashi N. Formation of bioactive N-doped TiO₂ on Ti with visible light-induced antibacterial activity using NaOH, hot water, and subsequent ammonia atmospheric heat treatment. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016;145:285-290. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.05.017.
5. Washio J, Ogawa T, Suzuki K, Tsukiboshi Y, Watanabe M, Takahashi N: Amino acid composition and amino acid-metabolic network in supragingival plaque. *Biomed Res.* 2016;37(4):251-257. doi: 10.2220/biomedres.37.251.
6. Abiko Y, Sato T, Sakashita R, Tomida J, Kawamura Y, Takahashi N: Profiling subgingival microbiota of plaque biofilms in the elderly. *J Oral Biosci.* 2016;58(2):62-65, doi:10.1016/j.job.2015.12.002.
7. Tian L, Sato T, Niwa K, Kawase M, Mayanagi G, Washio J, Takahashi N. PCR-dipstick DNA chromatography for profiling of a subgroup of caries-associated bacterial species in plaque from healthy coronal surfaces and periodontal pockets. *Biomed Res.* 2016;37(1):29-36. doi: 10.2220/biomedres.37.29.
8. Takahashi N. Oral Microbiome metabolism: from "who are they?" to "what are they doing?". *J Dent Res.* 2015 Dec;94(12):1628-1637. doi: 10.1177/0022034515606045.
9. Sato T, Tomida J, Naka T, Fujiwara N, Hasegawa A, Hoshikawa Y, Matsuyama J, Ishida N, Kondo T, Tanaka K, Takahashi N, Kawamura Y. *Porphyromonas bronchialis* sp. nov. isolated from intraoperative bronchial fluids of a patient with non-small cell lung cancer. *Tohoku J Exp Med.* 2015;237(1):31-37. doi: 10.1620/tjem.237.31.
10. Norimatsu Y, Kawashima J, Takano-Yamamoto T, Takahashi N. Nitrogenous compounds stimulate glucose-derived acid production by oral *Streptococcus* and *Actinomyces*. *Microbiol Immunol.* 2015;59(9):501-506. doi: 10.1111/1348-0421.12283.
11. Ishiguro K, Washio J, Sasaki K, Takahashi N. Real-time monitoring of the

metabolic activity of periodontopathic bacteria. *J Microbiol Methods*. 2015;115:22-26. doi: 10.1016/j.mimet.2015.05.015.

12. Sato T, Kenmotsu S, Nakakura-Ohshima K, Takahashi N, Ohshima H: Responses of infected dental pulp to TCP containing antimicrobials in rat molars. *Arch Histol Cytol*. 2015;73(4+5):165-175. <http://doi.org/10.1679/aohc.73.165>.

13. Ishida N, Sato T, Hoshikawa Y, Tanda N, Sasaki K, Kondo T, Takahashi N: Microbiota profiling of bronchial fluids of patients with pulmonary carcinoma. *J Oral Biosci*. 2015;57(2):110-117. doi:10.1016/j.job.2014.11.001

14. Tian L, Sato T, Niwa K, Kawase M, Tanner AC, Takahashi N. Rapid and sensitive PCR-dipstick DNA chromatography for multiplex analysis of the oral microbiota. *Biomed Res Int*. 2014;2014:180323. doi: 10.1155/2014/180323.

15. Tanda N, Hinokio Y, Washio J, Takahashi N, Koseki T. Analysis of ketone bodies in exhaled breath and blood of ten healthy Japanese at OGTT using a portable gas chromatograph. *J Breath Res*. 2014 Nov 24;8(4):046008. doi: 10.1088/1752-7155/8/4/046008.

16. Ogawa T, Washio J, Takahashi T, Echigo S, Takahashi N. Glucose and glutamine metabolism in oral squamous cell carcinoma: insight from a quantitative metabolomic approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014;118(2):218-225. doi: 10.1016/j.oooo.2014.04.003.

17. Hasegawa A, Sato T, Hoshikawa Y, Ishida N, Tanda N, Kawamura Y, Kondo T, Takahashi N. Detection and identification of oral

anaerobes in intraoperative bronchial fluids of patients with pulmonary carcinoma. *Microbiol Immunol*. 2014;58(7):375-381. doi: 10.1111/1348-0421.12157.

18. Washio J, Shimada Y, Yamada M, Sakamaki R, Takahashi N. Effects of pH and lactate on hydrogen sulfide production by oral *Veillonella* spp. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(14):4184-4188. doi: 10.1128/AEM.00606-14.

19. Nakajo K, Takahashi M, Kikuchi M, Takada Y, Okuno O, Sasaki K, Takahashi N. Inhibitory effect of Ti-Ag alloy on artificial biofilm formation. *Dent Mater J*. 2014;33(3):389-393. https://www.jstage.jst.go.jp/article/dmj/33/3/33_2013-334/_pdf/-char/en

〔学会発表〕（計45件、内24件を掲載）

1. Manome A, Abiko Y, Kawashima J, Fukumoto S, Takahashi N: Lactose and glucose metabolism of oral *Bifidobacterium* and its fluoride-inhibition. The 95th IADR General Session & Exhibition, 2017.

2. 馬目歩実, 安彦友希, 川嶋順子, 福本敏, 高橋信博: 口腔 *Bifidobacterium* 属のグルコースおよびラクトース代謝とフッ化物による抑制効果, 第6回口腔保健用機能性食品研究会・総会, 2017.

3. Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Nakajo K, Domon H, Takahashi N: Evaluation of pH using an ISFET at the bacteria/restorative materials interface. International Symposium on Biomedical Engineering, 2016.

4. Kawashita M, Endo N, Watanabe T, Miyazaki T, Furuya M, Yokota K, Kanetaka H, Abiko Y, Takahashi N: Bioactive titanium with visible-light induced antibacterial activity. 10th World Biomaterials Congress

(WBC2016), 2016.

5. Tian L, Sato T, Niwa K, Kawase M, Mayanagi G, Abiko Y, Washio J, Takahashi N: PCR-dipstick DNA chromatography for multiplex and semi-quantitative analysis of plaque biofilm microbiota. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium: The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science, 2016.

6. Washio J, Ishiguro K, Irie D, Uchiyama A, Takahashi N: A high sensitive fluorescence-mediated assessment of plaque metabolic activity. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium: The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science, 2016.

7. Manome A, Abiko Y, Kawashima J, Fukumoto S, Takahashi N: Inhibitory effects of fluoride on the carbohydrate metabolism of oral *Bifidobacterium*. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium: The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science, 2016.

8. Ishiguro T, Mayanagi G, Fukushima A, Sasaki K, Takahashi N: Fluoride-coated tooth surface inhibits bacteria-induced pH fall at the biofilm/tooth interface. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium: The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science, 2016.

9. 鷺尾純平, 石黒和子, 入江大貴, 内山愛理, 高橋信博: 蛍光色素を用いた口腔プラークバイオフィルム代謝活性の高感度測定法. 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016.

10. 安彦友希, 菅原敦信, 村上和弘, 川嶋順子, 高橋信博: 糖代謝の生化学的性質からみる *Bifidobacterium* の齲蝕関連性. 第58回歯

科基礎医学会学術大会, 2016.

11. 馬目歩実, 安彦友希, 川嶋順子, 福本敏, 高橋信博: 齲蝕関連 *Bifidobacterium* の酸産生活性とそのフッ化物による抑制効果. 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016.

12. 互野 亮, 末永華子, 鷺尾純平, 佐々木啓一, 高橋信博: 長期使用義歯からの細菌由来揮発性代謝産物の検出. 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016.

13. 鷺尾純平, 山本祐慈, 高橋信博: 亜硝酸塩による口腔内細菌に対する酸産生抑制機構. 第5回口腔保健用機能性食品研究会・総会, 2016.

14. Fukushima A, Mayanagi G, Sasaki K, Takahashi N: Effect of fluoride on titanium corrosion under *Streptococcus mutans* biofilm. The 63rd Annual Meeting of the Japanese Association for Dental Research, 2015.

15. Washio J, Yamamoto Y, Takahashi N: Nitrite inhibition on streptococcal acid-production and its biochemical mechanism. The 93rd IADR General Session & Exhibition, 2015.

16. Tian L, Sato T, Niwa K, Mayanagi G, Kawase M, Tanner ACR, Takahashi N: PCR-dipstick DNA chromatography for semi-quantitative analysis of oral microbiota. The 93rd IADR General Session & Exhibition, 2015.

17. Ishiguro K, Washio J, Sasaki K, Takahashi N: A novel method for real-time monitoring of bacterial metabolic activity. The 93rd IADR General Session & Exhibition, 2015.

18. Ishiguro T, Mayanagi G, Fukushima A, Sasaki K, Takahashi N: Fluoride-coating on tooth surface inhibits bacteria-induced pH-fall at biofilm-tooth interface. The 93rd IADR General Session & Exhibition,

2015.

19. 三木彩希, 真柳 弦, 安彦友希, 騎馬和歌子, 北川晴朗, 北川蘭奈, 林美加子, 高橋信博, 今里 聡: S-PRG フィラー含有コンボジットレジンの *Streptococcus mutans* の糖代謝活性に対する抑制効果, 第 143 回日本歯科保存学会 2015 年度秋季学術大会, 2015.

20. Takahashi N, Yamamoto Y, Shimizu K, Igarashi K: Inhibitory effects of nitrite on acid production of dental plaque. The 92nd IADR General Session & Exhibition, 2014

21. 鷺尾純平, 山本祐慈, 高橋信博: 亜硝酸塩の *Streptococcus mutans* 酸産生抑制機構をメタボロミクスで解明する. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 2014.

22. 石黒和子, 鷺尾純平, 佐々木啓一, 高橋信博: 蛍光色素を用いた細菌の代謝活性リアルタイム・モニター法の確立. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 2014.

23. 石黒朋子, 真柳 弦, 佐々木啓一, 高橋信博: バイオフィルム- 歯面インターフェイス pH 測定装置を用いた各種フッ化物の pH 低下抑制効果の評価. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 2014.

24. Kawashima J, Norimatsu Y, Yamamoto-Takano T, Shimauchi H, Tsuboi A, Takahashi N: Nitrogenous compounds stimulate the growth and acid-production of oral *Actinomyces*. The 62nd JADR General Session, 2014.

〔図書〕(計 2 件)

1. Marsh PD, Takahashi N, Nyvad B: Chapter 7: Biofilms in caries development. In: Fejerskov O, Nyvad B, Kidd E (eds.) *Dental Caries: The Disease and its Clinical Management*, 3rd Edition, Wiley-Blackwell, pp. 107-131, 2015,

2. Sato T, Kawamura Y, Yamaki K, Ishida N,

Tian L, Takeuchi Y, Hashimoto K, Abiko Y, Mayanagi G, Washio J, Matsuyama J, Takahashi N: Oral microbiota in crevices around dental implants: profiling of oral biofilm. In: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) *Interface Oral Health Science 2014: Innovative Research on Biosis-Abiosis Intelligent Interface*, Springer, Tokyo, pp. 45-50, 2015.

http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-55192-8_4.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 信博 (TAKAHASHI, Nobuhiro)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 6 0 1 8 3 8 5 2

(2) 研究分担者

小関 健由 (KOSEKI, Takeyoshi)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 8 0 2 9 1 1 2 8

泉福 英信 (SENPUKU, Hidenobu)
国立感染症研究所・細菌第一部第六室・室長
研究者番号: 2 0 2 5 0 1 8 6

坂本 光央 (SAKAMOTO, Mitsuo)
独立行政法人理化学研究所・微生物材料開発室・協力研究員
研究者番号: 5 0 3 2 1 7 6 6

鷺尾 純平 (WASHIO, Jumpei)
東北大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号: 2 0 4 0 0 2 6 0