

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：33703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840158

研究課題名(和文) 古人骨における歯石内細菌群のメタゲノム解析 古人類の口腔衛生環境復元手法開発

研究課題名(英文) DNA barcoding analysis on oral microbome in ancient dental calculus Japanese skeletal remain

研究代表者

矢野 航 (Yano, Wataru)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：80600113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：現代の歯学で除去される歯石には膨大な口腔細菌群の遺伝子情報が保存されている。古人骨の石灰化した歯石でもその中からDNA断片が採取でき衛生状態を復元する貴重な生体試料となる。本研究では京都大学所蔵の縄文人骨から歯石を採取し次世代シーケンサーを用いたDNAメタバーコーディング解析により彼らの口腔内細菌群を群集単位で解析することに成功した。またヒトに近く歯周病モデルとして考える霊長類のチンパンジーとレッサースローロリスの口腔細菌叢解析を行い、新種と思われる種の発見を始め、感染経路の一端、生態、食性、年齢などの宿主側と口腔細菌叢の相関モデルも構築することができた。

研究成果の概要(英文)：In the planned research, I successfully analyzed oral microbiome of ancient human population of Japan (Jomon people) using DNA meta-barcoding technique with Next generation sequencer (MiSeq, Illumina). I used ancient remain of dental calculus from Jomon people in Kyoto University. The material contained representative oral pathogenic species such as porphyromonas spp. which indicates the possible infection of periodontal diseases. In addition to the human data, to explore the diversity of pathogenic oral microbial species of closely related primates species such as Chimpanzees (Pan troglodytes) and Lesser slow loris (Nycticebus pygmaeus) and found new species of oral pathogenic species.

研究分野：自然人類学

キーワード：口腔細菌叢 次世代シーケンサー DNAメタバーコーディング解析 縄文人 歯石 歯周病 霊長類

1. 研究開始当初の背景

歯石が歯周病の原因となる悪しきものであったことはヒポクラテスの時代から知られていた。現代の歯学でもやはり除去の対象に過ぎない歯石だが、ここには膨大な口腔細菌群の遺伝子情報が保存されている。(1,2 この遺伝子情報を復元することができれば人類学者にとって古人類集団の衛生状態を復元する貴重な生体試料となる。実際、石灰化した歯石は古人骨でもよく残存しており、古人骨から口腔内環境を復元できる可能性を持つ(3 歯石に残る口腔細菌群は宿主である人間の地理、年齢、性別、疾患、生業などに適応して生き残った種で構成されているため、それらの個人情報を直接示す生きた資料となる可能性を秘めている(図 1)。これまでの遺伝子研究では、培養可能な既知の菌種を1種ずつシーケンスしなければならなかったが近年、いわゆる次世代シーケンサーの登場により、ユニバーサルプライマーを用いて細菌群集から丸ごと遺伝子領域を増幅し種集団の構造を明らかにするメタゲノム解析が利用可能となった(4。本研究ではこの技術を応用し、歯石内の口腔内細菌を群集単位でシーケンスし、その構成を解析するものである。

2. 研究の目的

歯石には口腔細菌群の膨大な遺伝子情報が残存している。本研究では次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析により縄文人歯石中の口腔内細菌群を群集単位で解析することを試みる。石灰化、タフオノミー、コンタミネーションで攪乱された、古代人歯石試料内の遺伝子情報をどのように回復し口腔環境を復元できるかを探索し、そのための頑強な復元方法を開発することが本研究の目的であった。

3. 研究の方法

(1) 現代人新鮮試料を用いた歯垢と歯石の群集比較 石灰化による影響の検証
新鮮な歯石および表面残存歯垢から口腔内細菌群の 16s rRNA を抽出し、次世代シーケンサーにより口腔内の細菌群集構成を復元する。新鮮な歯石/歯垢を用いることにより、遺伝子配列の断片化および塩基置換、土中細菌コンタミネーション、の影響を統制し、石灰化(歯石化)による細菌群構成の減少を検証する。解析では採取した歯石を十分洗浄した後、EDTA で脱灰を行って有機成分を抽出する。ここから RNA を抽出しライブラリを作成し京都大学霊長類研究所所蔵の次世代シーケンサー(MiSeq, illumina 社)を用いて、メタゲノム解析を行う。シーケンスには全生物に共通するユニバーサルプライマー(F24/Y36)を用いて試料内に含まれる口腔細菌群その他の生物の 16s rRNA 遺伝子(V1, V2, V3)を増幅する。出力された遺伝子データをヒト口腔細菌データベース

HOMD(Human Oral Microbiome Database: www.homd.org)に照合して未知の種を含めた細菌種の同定を行う。この方法を歯垢と歯石で比較を行う。

(2) 縄文人試料の断片化および塩基置換率 タフオノミーによる劣化の検証

塩基置換は一定の確率で生じることが知られているためこれを検証する。また RNA がの塩基配列が土中で切れる断片化も起こることが知られており、ユニバーサルプライマー(F24/Y36)による増幅領域(V1, V2, V3)で切断が起こる可能性がある。よって、歯石内のゲノム断片の長さを計測し、その短縮率を劣化過程としてする。断片化が起こっていた場合は、古代 DNA の手法(Adler et al., 2013)を用いてゲノムライブラリの作成を行う。

(3) 現代人と縄文人の比較—土中細菌群のコンタミネーションの検証

縄文人骨資料は京都大学、国立科学博物館、新潟大学などの研究施設に散在するが、本研究ではまず京都大学博物館に所蔵される縄文人骨から歯石を採取し、洗浄を行う。(1)と同じ方法でメタゲノム解析を行い、ゲノムデータを得る。得られた口腔細菌群構成データ(2)で構築したモデルに照らしあわせて、当該人骨の口腔内環境を復元する。できるだけ多くの歯石サンプルでシーケンスを繰り返し、複数の人骨からの衛生状態推定を行う。現代人と縄文人の比較から口腔内衛生の時代間変異を考察する。

4. 研究成果

(1) 古人骨歯石内に残る微化石解析

本研究では京都大学が所蔵する縄文人骨から歯石を採取し次世代シーケンサーを用いた DNA メタバーコーディング解析により古人骨歯石中の口腔内細菌群を群集単位で解析することに成功した。寄生側である細菌叢の存在は一種の生態系として宿主(縄文人)の口腔環境を反映する。現在、齲蝕や歯周病などの現代人の口腔病理を口腔細菌叢をメタバーコーディング技術によって理解する研究が歯科医学や獣医学の臨床医学分野中心に行われているが、*Porphyromonas gingivalis* などの代表種の存在レベルから多様なネットワーク解析に至るのはこれからである。参照となる口腔細菌のデータベースを構築するため本研究ではヒトに近く歯周病モデルとして考えられる霊長類のチンパンジーとレッサースローロリスの口腔細菌叢解析を行い、新種と思われる種の発見を始め、感染経路の一端を明らかにするとともに、生態、食性、年齢などの宿主側と口腔細菌叢の相関モデルも構築することができた。

(2) 歯周病疾患霊長類モデルにおける口腔細菌叢解析 1 類人猿チンパンジー

口内諸疾患(歯周病、齲蝕、膿疱、歯の脱落)は野生チンパンジーの骨格に多く観察される病変であることが知られている。このうち

特に歯周病の有病率が高いとされる。歯周病には複数の原因菌(桿菌とスピロヘータ)が知られているが、そのうちの多くが糖を代謝できず、たんぱく質やアミノ酸、血液成分を栄養源としている。歯肉炎が進行すると歯周炎となり、歯周ポケットを形成し、歯槽骨の吸収がみられる。歯周病菌はグラム陰性嫌気性細菌であることから、感染経路としては直接接触感染と湿性媒介物を介した感染が考えられる。骨格標本の観察からヒト上科野生霊長類には歯周病罹患に関して種間差がみられることがわかってきた。しかし、これまでに野生ヒト上科霊長類における感染経路や増殖プロセスに関する体系的な理解はこれまでほとんど進んでいない。歯周病に罹患すると歯周ポケットの形成や歯槽骨吸収、歯の生前脱落がみられる。黒色素産生菌による色素の沈着が歯根部にみられることが多い。慢性歯周炎の場合、プラークや歯石の量と関連が強く、骨になった時、歯槽骨の退縮とともに歯に歯石の沈着がみられるなどの特徴がある。本発表で発表者らは、ヨーロッパの博物館所蔵の大型類人猿の頭蓋骨格標本を用いて歯周病の種間変異を報告する。また、2002年以降フィールド(カリンズ)で収集したヒガシチンパンジー4個体に見られた歯周病を合わせて報告した。

(3)歯周病疾患霊長類モデルにおける口腔細菌叢解析 2 原猿レッサースローロリス
近年、日本モンキーセンター(JMC)飼育のレッサースローロリス(*Nycticebus pygmaeus*)に広範な歯周病感染が見られることが分かった(寺尾ら, 2016)。彼らに歯周病菌の感染が起こったことが示唆されるが、口腔細菌がどのように広がるのか、その経路は不明である。食物分配などがなく、接触感染機会が少ない単独性霊長類レッサースローロリスにおける口腔細菌の感染経路を解明するために、JMC 内で歯周病と診断された個体の口腔及び皮膚の湿性試料を採取し、含まれる細菌叢をメタバーコーディング解析により網羅的に探索した。同じ個体内で異所的に存在する細菌叢の比較し、場所間での類似性から細菌感染経路の検討を行った。[材料と方法] JMC で飼育されているレッサースローロリスのべ6頭から、口腔内【歯垢(上下顎8箇所)、唾液、舌苔】、口腔外【上腕部の腺液、耳垢】の湿性試料を採取し、Lysis buffer 液に保存後、細菌叢 DNA を抽出・精製した。ユニバーサルプライマーで16S rRNA の部分領域をPCRで増幅後、シーケン斯拉イブラリを作成し、次世代シーケンサー(MiSeq, Illumina)を用いて細菌種構成を同定した。[結果と考察] 各歯種および舌、唾液間に異所的に存在する細菌叢の比較から、レッサーロリスの口腔細菌叢の空間的分布と相互関係が明らかとなった。またプラーク除去処置が行われた1頭の処置前後データ比較から、細菌種構成の経時的变化が観察された。また、上腕腺を舐め

るそれを防御毒として子供に塗布するレッサースローロリスの特異的行動が細菌叢間の交流に与える影響を考察し、同種での歯周病菌感染リスクを検討した。

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1件)

金澤英作, 小山田常一, 北川賀一, 真鍋義孝, 矢野航, 今井啓雄, ... & 米田穰. (2015). 歯の人類学分科会 平成 26 年度シンポジウム 「歯の付着物をめぐって」. *Anthropological Science (Japanese Series)*, 123(1), 51-58.

〔学会発表〕(計5件)

矢野航, 橋本千絵, 清水大輔. ヒト上科霊長類における歯周病 第 60 回プリマーテス研究会. 犬山 2016 年 1 月

矢野航, Henry G Amanda, 今井啓雄, 江尻貞一. 古人骨歯石内に残る微化石解析 第 68 回日本人類学会大会. 浜松 2014 年 11 月

矢野航, 渡邊竜太, 佐藤和彦, 小萱康徳, 中務真人, 江尻貞一 X線蛍光分析器を用いた歯石表面の元素構成比率計測の試み. 第 67 回日本人類学会大会. 筑波 2013 年 11 月

矢野航, 清水大輔, 早川卓志, 橋本千絵. 野生チンパンジーにおける口腔細菌叢の伝播と食物分配 2017 年度ワンバ・カリンズ研究会 犬山 2017 年 4 月

矢野航, 清水大輔, 寺尾由美子, 岡部直樹, 早川卓志 レッサースローロリス (*Nycticebus pygmaeus*) 個体内において部位間で異所的に適応する細菌叢 第 33 回日本霊長類学会 福島 2017 年 7 月

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 航 (YANO, Wataru)
朝日大学・歯学部 助教
研究者番号：80600113

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

Henry G. Amada
独・マックスプランク進化人類学研究所
京都大学・霊長類研究所・准教授
今井 啓雄 (IMAI Hiroo)
研究者番号：60314176
早川 卓志 (HAYAKAWA Takashi)
京都大学・霊長類研究所・特定助教
研究者番号：00758493