

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2022
課題番号：21K17212
研究課題名（和文）舌マイクロバイオーーム制御実現に向けたポリフェノールの有用性の検証

研究課題名（英文）Validity of polyphenols for control of tongue microbiota

研究代表者

朝川 美加季 (Asakawa, Mikari)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：90852583

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ポリフェノール（PPs）成分が舌マイクロバイオーーム（MB）の細菌構成に与える影響を検証するため、舌苔検体を用いて添加培養実験を行い、成分の添加有無での培養後の細菌構成の違いを次世代シーケンサーを用いて評価した。解析の結果、成分添加群は成分非添加群と比較して培養6時間および12時間後にStreptococcus属の構成比率の有意な増加が認められた。その一方で、培養6時間および12時間後にVeillonella属やHaemophilus属などの細菌属の構成比率の有意な低下が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔MBが口腔疾患だけでなく全身の健康にも影響を及ぼしていることが次々と報告され、それに伴い近年では病原性の高いMBに関しても理解が進みつつある。疾患リスクの高いMBを、いかにして疾患リスクの低いMBに変化させることができるのか、その要因の解明が重要な課題となっている。本研究では、PPsが舌MBの細菌種構成制御に有効である可能性が示された。本研究結果は、PPsが舌MBの「プレバイオティクス」として機能することの科学的根拠となり、PPsは食品添加物としても幅広く使用されていることから、様々な場面で即時に応用されることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to investigate the validity of polyphenols (PPs) for control of tongue microbiota. Tongue microbiota samples were cultivated for 12h in basal medium containing mucin and PPs to assess its effects on the growth of tongue microbiota. Significantly higher relative abundance of Streptococcus and lower relative abundances of Veillonella and Haemophilus were observed in microbiota cultured in the medium with PPs for 6h and 12h compared to that in the medium alone. These results suggest that PPs affects the bacterial composition of the tongue microbiota.

研究分野：予防歯科学

キーワード：舌マイクロバイオーーム 16S rRNA遺伝子解析 ポリフェノール

1. 研究開始当初の背景

コーヒーや茶類、赤ワインといったPPsを多く含む飲食物が、肥満や糖尿病をはじめとする生活習慣病や認知症など様々な疾患の発症予防や症状改善と関連することが、多くの大規模疫学研究において示唆されている(文献1~3)。PPsは植物が二次代謝産物として産生するフェノール性ヒドロキシ基を複数持った植物性化合物の総称で、構造上の特徴からいくつかのサブクラスに分類されており、その数は数千種類にもものぼる。PPsはコーヒーや茶類などの飲料のほか、大豆やブドウなど野菜や果物にも多く含まれていることが知られており、我が国においては着色料や酸化防止剤等の食物添加物としても幅広く使用されている。PPsが全身の健康に寄与するメカニズムとしては、PPsの抗酸化作用や酵素活性阻害作用、タンパク質機能調節作用などが一般的に知られているが、それに加え、腸管に運ばれたPPsやその代謝物質が腸内細菌の栄養源となり、腸管マイクロバイオーム(MB)のバランスを制御する「プレバイオティクス」としての働きも注目を集めている。

近年、次世代シーケンサー(NGS)の登場により、常在MBが宿主の健康維持に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。それは口腔においても例外ではなく、う蝕や歯周病といった口腔疾患のみならず、肺炎や糖尿病といった全身疾患にも口腔MBが関係していることが示唆されている。申請者らはこれまでに、*Prevotella*や*Veillonella*などの嫌気性細菌が優勢な舌MBの細菌構成パターンが肺炎死亡や口腔の健康状態の悪化と有意に関連していたことを明らかにした。このような背景から、舌MBの質の管理の徹底は口腔疾患のみならず全身疾患予防においても重要な役割を果たす可能性が示唆されるが、疾患リスクの高い細菌構成パターンの舌MBを、疾患リスクの低い細菌構成パターンへとバランスシフトさせる方法やそれに関わる因子についてはほとんどわかっていないのが現状である。PPsがプレバイオティクスとして腸管MBのバランスを制御していることから、申請者はPPsが口腔MBの制御に関わる要因の一つでないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、舌MBの細菌構成制御を目指し、PPsが舌MBの細菌構成に与える影響を明らかにすることである。

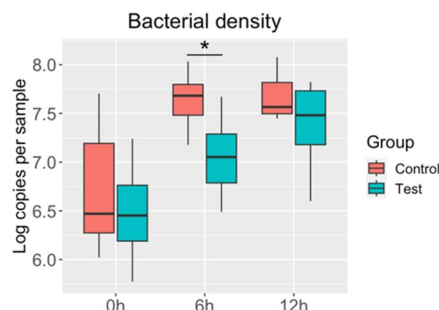
3. 研究の方法

本研究では、採取した舌苔検体に成分を添加し、培養後の細菌構成を比較することによって舌MBに与える影響について評価した。対象者には採取1時間前に水以外の飲食物の摂取および口腔清掃を控えてもらい、午前8時から9時の間に舌苔検体の採取を行った。検体採取には直径15mmの不織布を貼り付けた回転式の電動歯ブラシを使用し、細菌の定量的な評価も行えるようにした。本研究ではPPs成分としてコーヒー抽出液を用いて添加培養実験を行った。舌苔検体の培養にはBMM(basal medium containing mucin)合成培地を使用した。BMM培地に成分を添加した試験培地(添加群)と非添加のコントロール培地(非添加群)を用意し、その中に舌苔が付着した不織布を加えた。ベースライン時と6時間および12時間培養後(5%CO₂、37°C下)の添加群と非添加群の培養液をそれぞれ回収し、細菌構成解析を行った。回収した舌苔検体から、ビーズ粉砕法を用いてDNAを抽出後、細菌共通配列プライマーである8Fと338Rを用いて16S rRNA遺伝子のV1-V2領域を用いて網羅的に増幅後、次世代シーケンサーのIon PGM(Thermo Fisher Scientific社)を用いて増幅断片の塩基配列を解読した。得られた塩基配列データは、expanded Human Oral Microbiome Database(eHOMD)の配列データとRDP(Ribosomal Database Projects) classifierを用いて各検体に含まれる細菌種を同定し、細菌構成を明らかにした。また、定量PCR法を用いて単位面積あたりの総細菌量を測定した。

4. 研究成果

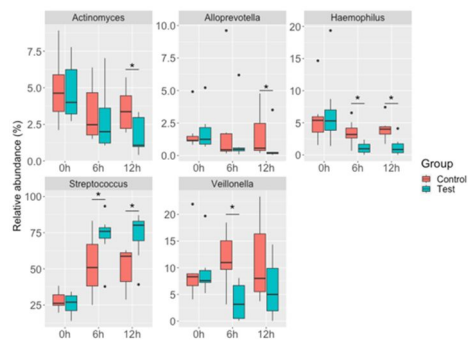
定量PCR法による解析の結果、培養6時間後において成分添加群の総細菌量は成分非添加群と比較して有意に低くなっていた。一方で、培養12時間後においては成分添加群と非添加群で総細菌量に有意差は認められなかった(図1)。この結果から、PPs成分が細菌増殖を抑制する可能性が示された。

次世代シーケンサーによる細菌構成解析の結果、培養6時間後および12時間後において、菌種多様性の指標であるShannon indexが添加群において有意に低くなっていた。平均構成比率が1%以上を占めていた細菌属について比較を行ったところ、添加群において培養6時間後および12時間後に*Streptococcus*属の構成比率の有意な増加が認められた。一方で、培養6時間後に*Veillonella*属、*Haemophilus*属の構成比



(図1) 成分添加による舌苔細菌量への影響

率が添加群において有意に低くなっており、さらに培養 12 時間後には *Alloprevotella* 属、*Haemophilus* 属の構成比率の有意な低下が認められた(図 2)。以上の結果から、PPs 成分が舌苔の細菌量および細菌構成に影響を与える可能性が示された。特に疾患リスクの高い細菌構成パターンにおいて優勢な *Veillonella* 属の構成比率の低下に関連していたことから、PPs 成分が腸管 MB だけでなく口腔 MB のプレバイオティクスとして細菌構成バランスの制御に寄与できる可能性が示された。今後は、口腔 MB 制御による口腔の新たな健康管理アプローチ開発に向けて、更なる候補成分の探索を進めていきたい。



(図2) 成分添加による舌苔細菌構成への影響

- (文献 1) Grosso G et al., *Eur J Nutr.* 2018; 57(4):1535-1544.
- (文献 2) Wisnuwardani RW et al., *Eur J Nutr.* 2020; 59(2):801-802.
- (文献 3) Lefevre-Arbogast S et al., *Neurology.* 2018; 90(22):e1979-e1988.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chen BJ, Takeshita T, Tajikara T, Asakawa M, Kageyama S, Shibata Y, Ayukawa Y, Yano Y, Yamashita Y.	4. 巻 8(1):e0049022
2. 論文標題 Butyrate as a Potential Driver of a Dysbiotic Shift of the Tongue Microbiota	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/msphere.00490-22.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 陳柏蓉, 朝川美加李, 竹下徹, 鮎川保則, 山下喜久
2. 発表標題 口腔常在細菌叢制御に有用な成分の探索にむけたBMM合成培地の培養条件の検討
3. 学会等名 第43回九州口腔衛生学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------