

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22406034

研究課題名(和文)日本と韓国の国際比較による成人口腔保健に関わる病因・環境および社会背景要因の解明

研究課題名(英文) Study about pathogenic, environmental, and social factors of oral health in adult population by comparing Japan and South Korea

研究代表者

嶋崎 義浩 (Shimazaki, Yoshihiro)

九州大学・歯学研究科(研究院)・共同研究員

研究者番号：10291519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円、(間接経費) 4,020,000円

研究成果の概要(和文)：日本人と韓国人は遺伝的に極めて近縁な関係にあるが、両国の国家統計を比較すると韓国人に比べ日本人は歯周病有病率が高い傾向にあるといえる。この差は口腔細菌叢の構成の違いに起因する可能性があるため、採取した唾液から細菌叢構成の比較を行った。韓国人に比べて日本人の口腔マイクロバイオームでは *Neisseria* の割合が少なく、*Prevotella*、*Veillonella* がより優勢であった。我々の以前の研究では歯周炎患者の唾液で *Prevotella*、*Veillonella* がより高比率を占めていた。これは、口腔細菌叢の構成の違いが韓国人よりも日本人に歯周病有病率が高い理由である可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：A comparison of national surveys on oral health suggested that the population of South Korea has better periodontal health status than that of Japan, despite their similar inherent background. Here, we investigated differences in oral bacterial assemblages between Korean and Japanese orally healthy adults. The microbiota of Japanese subjects comprised a more diverse community, with higher proportions of 17 bacterial genera, including *Veillonella*, *Fusobacterium* and *Prevotella*, as compared with those of Korean subjects. Conversely, *Neisseria* and *Haemophilus* species were present in much lower proportions in the microbiota of Japanese subjects. Because higher proportions of *Prevotella* and *Veillonella* and a lower proportion of *Neisseria* were implicated in periodontitis in our previous study, the results of this study suggest that the greater proportion of dysbiotic oral microbiota in the Japanese subjects is related to their higher susceptibility to periodontitis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：医療・福祉 歯学 国際比較

1. 研究開始当初の背景

これまで、歯科疾患のリスク因子解明や歯科疾患予防に関する研究は、日本国内の調査に基づいて行われることが一般的であった。日本と諸外国とでは、文化や生活習慣の違いだけではなく、医療保険制度や医療環境など健康に関わる社会背景要因が異なっていると考えられるが、歯科疾患の有病状況について諸外国と比較した研究はいくつか見受けられるものの、諸外国との口腔保健状態の違いに影響を及ぼすと思われる様々な要因を多角的に調べて比較した研究は行われていない。

そこで、日本と韓国で口腔保健状態の違いがある可能性を疑い、韓国の研究者との共同研究により両国が行った口腔保健調査の結果を基に成人集団の口腔保健状態の比較を行ったところ(*J Dent Hlth* 59:596-602, 2009)、日本成人は韓国成人に比べて DMF 歯数が顕著に多く、深い歯周ポケット保有を表す CPI 個人コード 3 または 4 の割合も多かった。日本は韓国に比べて単位人口あたりの歯科医師数が多く、歯科医療保険体制も充実しているにも関わらず、韓国成人は日本成人より口腔保健状態が良好であることから、両国の口腔保健状態の違いに影響を及ぼす要因を解明する研究を行うことは我が国の今後の口腔保健状態を改善していくうえで有効であると考えに至った。また両国の調査は、調査方法が異なっていることや、診査基準の統一を図るキャリブレーションが行われていないなどの問題もあった。

また、両国住民の口腔細菌叢の網羅的な解析により口腔保健状態に関わる細菌学的な分析を行い、環境要因・社会背景要因の分析結果と合わせて二国間の国際的な比較から口腔保健状態の違いに影響を及ぼす要因を総合的に評価・検討したいと考えた。

2. 研究の目的

遺伝子的変異を示す標準的 SNP 頻度の解析から、同じモンゴロイド人種の中でも日本人と韓国人が遺伝子的に極めて近縁な関係にあることが示唆されている。一方で、食生活をはじめとした生活習慣や歯科医療保険制度などの社会保障体制など両国間には大きな相違があるが、両国の国家統計調査を比較すると韓国の方が口腔保健状況は良好である。しかし、両国で行われた調査の基準は必ずしも同一ではないために、同じ基準の調査データをもとに比較を行う必要がある。そこで、本研究では、日韓両国で比較可能な口腔保健に関する疫学データを整備し、また、両国で行う疫学調査の際に採取する唾液試料中の口腔細菌構成を比較することにより、両国の口腔疾患の状況に口腔細菌構成が及ぼす影響について明らかにする。

3. 研究の方法

1) 研究対象

研究対象者は、日本人は 2007 年久山町研究の参加者、韓国人は 2011 年楊平郡研究の参加者とした。なお、本研究の遂行にあたっては九州大学医系部局地区臨床研究(観察研究)倫理審査委員会の承認およびソウル大学校歯医大学院倫理委員会の承認を受けた。

久山町研究

久山町研究では、1961 年から、福岡市に隣接した糟屋郡久山町の住民を対象に心血管疾患などの追跡調査を実施している。久山町の人口は約 8,000 人で、全国平均とほぼ同じ年齢・職業分布を持ち、平均的な日本人集団と考えられる

追跡調査の一環として、2007 年に 40 歳以上の久山町住民を対象とした健康診査が実施され、口腔内診査も行われた。40 歳から 79 歳までの住民 2,861 人(全住民の 75.1%)が健康診査を受診した。このうち、口腔内診査を受けた者は 2,669 人で、データの欠落があった者や唾液採取ができなかった者 297 人を除外し、2,272 人(男性 1,011 人、女性 1,261 人)を久山町研究の分析対象者とした。

楊平郡研究

楊平郡研究は、韓国における心血管疾患ゲノム研究の一部として、2004 年から楊平郡で実施されている。楊平郡はソウルの郊外に位置し、ソウルから東に 45 km の場所にある。2010 年における楊平郡の全人口は 78,490 人で、40 歳から 79 歳までの人口は 45,298 人である。

楊平郡研究の第一期(ベースライン)は 2004 年から 2006 年に実施され、楊平郡住民の 3,398 人が参加した。2010 年から 2013 年の第三期から口腔内診査が実施されている。本研究の対象者は、2011 年の楊平郡研究に参加した 40 歳から 79 歳の住民とし、676 人が口腔内診査や唾液採取を含む健康診査を受診した。このうち、データの欠落があった者や唾液採取ができなかった者 133 人を除外し、543 人(男性 198 人、女性 345 人)を楊平郡研究の分析対象者とした。

2) 調査方法

口腔内診査

久山町研究と楊平郡研究では、口腔の健康状態として、現在歯数、う蝕経験状態(未処置歯数、処置歯数、喪失歯数、DMF(decayed, missing, and filled)歯数、義歯の装着状況、歯周組織の健康状態を評価した。

唾液採取

2 分間ガムを咀嚼し、その間に口腔内に貯留した唾液をサンプルチューブに吐きだしてもらい、唾液を採取した。唾液検体の採取後、氷上で保管し、その後細菌 DNA を抽出するまで -30 で凍結保存した。

3) 唾液細菌叢の分析

唾液検体からの DNA の抽出

ビーズ破砕法を用いて唾液検体から DNA を

抽出した。

Tenninal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法による解析

同遺伝子においてほとんどの細菌に共通な塩基配列部位である 8F (5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG- 3')、806R (5'-GGA CTA CCR GGG TAT CTA A-3') をプライマーとして使用し、PCR 法を用いて 16S rRNA 遺伝子の網羅的増幅を行った。精製した 16S rRNA 遺伝子増幅断片を含む溶液は制限酵素 Hae (認識配列は GGCC) 5 U を用いてキャピラリー電気泳動を行った。データの取り込みおよび解析は GeneMapper version 4.0 (Applied Biosystems, USA) を用いて行った。これにより、それぞれの細菌叢の構成を横軸に細菌種、縦軸に細菌の量を反映した波形パターンとして表した。

2,815 名の波形パターンは、解析言語 R version 3.0.1 (R Development Core Team 2012) を用いて主成分分析 (Principal Component Analysis; PCA) を行い、検体間の類似度関係を第一、第二主成分を示す散布図として視覚化した。

バーコードパイロシーケンシング法による解析

全 2,815 名の被験者のなかから、以下の条件で健康な口腔を維持している者を選出し、バーコードパイロシーケンシング法を用いて細菌構成のより詳細な解析を行った。本研究で用いた「健康な口腔」の基準は以下のとおりである。24 歯以上の現在歯をもつ、義歯を使用していない、未処置歯をもたない、う蝕経験歯数 10 歯以下、深さ 4 mm 以上の歯周ポケットが認められない、5 mm 以上の臨床的アタッチメントロスが認められない、プロービング時に出血の認められる部位が 10%未満である。この基準により 52 名の韓国人と 88 名の日本人を選出した。

選出された 140 名の被験者の DNA 検体はそれぞれ 454 Life Sciences adapter A 配列と患者ごとに異なる 10 塩基のバーコード配列を付加した 27F (5'-CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG XXX XXX XXX XAG AGT TTG ATC MTG GCT CAG-3') と 454 Life Sciences adapter B 配列を 5'末端側に追加した 338R (5'-CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TCT CAG TGC TGC CTC CCG TAG GAG T -3') をプライマーとして PCR 法を用いて 16S rRNA 遺伝子 V1-V2 領域の網羅的増幅を行った。

精製された各増幅断片は NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA) を用いて DNA 濃度と純度を測定した後、塩基配列を決定した。塩基配列の決定は北海道システム・サイエンス株式会社 (札幌市) に受託して行った。

塩基配列データの解析

バーコード配列を除去した全ての塩基配列データは 16S rRNA 遺伝子解析ソフトウェアパッケージ QIIME (Caporaso et al., 2010) を用いて 97%以上の塩基配列相同性の認め

られる配列を解析操作上同一菌種 (operational taxonomic unit: OTU) の配列とみなし、代表配列の抽出と同一配列の計数を行った。

次に、キメラ配列を除去した塩基配列データを用い、まず解析言語 R を用いて各検体から検出菌種数、Phylogenetic diversity、Shannon diversity index の算出を行った。続いて各検体間の細菌構成の類似度の算出を行った。細菌群集間の類似度には検出された代表塩基配列の有無に加え配列同士の系統学的距離を考慮した指標 UniFrac (Lozupone and Knight 2005) を用い、140 検体全ての組み合わせについて菌叢類似度を算出した。本指標では細菌構成が完全に一致している場合は 0、完全に異なる場合は 1 を示す。UniFrac の算出は QIIME を用いて行った。解析言語 R を用いて主座標分析 (Principal Coordinate Analysis: PCoA) を行い、第一、第二主座標を示す散布図において各被験者間の細菌叢の類似度関係を視覚化した。さらにそれぞれの検体の細菌構成の詳細を明らかにするため、代表配列を RDP Classifier (Wang Q et al. 2007) を用いて菌属レベルまでの特定を行った。Confidence threshold が 60%以上であれば該当菌属とみなした。加えて両国の細菌構成の違いに関わる重要な OTU を特定するために解析言語 R を用いて partial least-squares discrimination analysis (PLS-DA) を行った。重要度を示す指標である variable importance in projection (VIP) (Perez-Enciso and Tenenhaus 2003) が 2 を超えるものを key OTU とみなした。key OTU については HOMD (Chen et al., 2010) に登録されている 831 の口腔細菌の 16S rRNA 遺伝子配列に対して BLAST 解析を行い、98%以上の相同性が認められた場合該当の菌種とみなした。

統計学的分析

統計学的分析は全て解析言語 R version 3.0.1 (R Development Core Team 2012) を用いて行った。両国の検出菌種数、Phylogenetic diversity、Shannon diversity index、各菌門および菌属の構成比率の比較は Student の t 検定を行った。UniFrac を用いた両国の細菌群集の全体構成の違いの有無については Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) を用いて検定を行った。いずれの解析においても p 値が 0.05 以下であれば有意とした。

4. 研究成果

【口腔の健康状態】

口腔の健康状態の結果を表 1 に示す。楊平郡民に比べ、久山町民は、未処置歯数は少ないが DMF 歯数は多く、歯周健康状態が不良な傾向であった。

表 1. 久山町民と楊平郡民における口腔の健康状態 [n (%)]

	久山町民 (n = 2,272)	楊平郡民 (n = 543)
年齢*	59.9 ± 10.3	61.1 ± 8.9
男性	1011 (44.5)	198 (36.5)
現在歯数†	22.6 ± 7.5	24.4 ± 6.2
≥ 24 歯	1405 (61.8)	378 (69.6)
< 24 歯	867 (38.2)	165 (30.4)
義歯の装着あり	626 (27.6)	91 (16.8)
DMF 歯数*	19.3 ± 6.6	10.3 ± 7.2
≤ 10 歯	252 (11.1)	322 (59.3)
> 10 歯	2020 (88.9)	221 (40.7)
未処置歯数*	0.7 ± 1.6	1.7 ± 2.2
0 歯	1598 (70.3)	232 (42.7)
≥ 1 歯	674 (29.7)	311 (57.3)
PD ≥ 4 mm 保有歯数**	10.7 ± 19.4	3.6 ± 10.8
0 歯	1341 (61.2)	440 (81.9)
≥ 1 歯	851 (38.8)	97 (18.1)
CAL ≥ 5 mm 保有歯数†	9.7 ± 18.9	4.7 ± 11.5
0 歯	1441 (65.7)	399 (74.3)
≥ 1 歯	751 (34.3)	138 (25.7)
%BOP**	19.8 ± 23.3	17.2 ± 19.3
≤ 20	1433 (65.4)	369 (68.0)
> 20	759 (34.6)	168 (31.3)

* 平均値 ± 標準偏差

† 検査対象歯がない者を除外; 久山市民 (n = 2,192), 楊平郡民 (n = 537)

【唾液中細菌構成の分析】

T-RFLP 法を用いた唾液中細菌構成の比較 T-RFLP ピークパターンの両集団での差異の有無を視覚化するために主成分分析を行い、全検体の類似度関係を第一、第二主成分を両軸とした散布図として示した (図 1)。

両群の差異に強く関わる TRF (ピーク) を解析すると、韓国人被験者に比べ日本人被験者の唾液中には Prevotella 属、Veillonella 属の菌種がより優勢であり、Neisseria、Haemophilus、Porphyromonas といった細菌の構成比率が低いことが示唆された。

バーコードパイロシーケンシング法による解析

前述の全被験者に対する T-RFLP 法を用いた分析において両国の被験者の細菌構成に注目すべき差異が認められた一方で、この違いは単に表 1 で示した両集団の口腔の健康状態の違いを反映しているだけである可能性が残る。そこで我々は両集団から口腔の健康を維持している被験者を選出し、口腔状態の口腔細菌構成に与える影響を排除した地域

差の解明を目指した。2,815 名の被験者のうち、52 名の韓国人被験者 (女性 39 名、男性 13 名、54 ± 6 歳) と 88 名の日本人被験者 (女性 41 名、男性 47 名、54 ± 6 歳) が「対象および方法」に示した条件に基づき選出された。これらの被験者は図 1 で示した主成分分析プロットにおいては第一主成分の負の方向に局在しており (図 2)、全被験者のなかでは唾液中に Neisseria、Haemophilus、Porphyromonas の菌種がより優勢で、Prevotella 属、Veillonella 属といった細菌の構成比率が小さな被験者であることが示唆された。

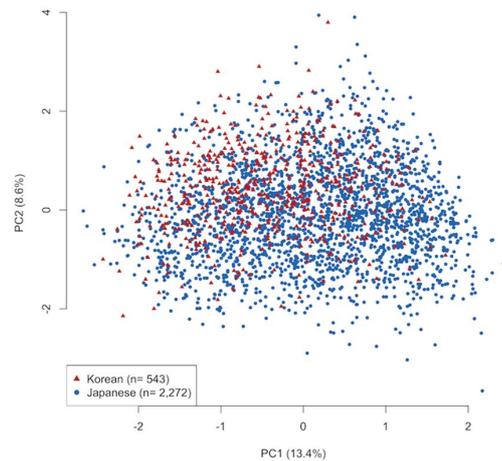


図 1. 全被験者 2,815 名の T-RFLP ピークパターンの類似度関係。主成分分析を行い、第一、第二主成分を両軸とした散布図として示した。両主成分によって全分散の 22.0% を表している。

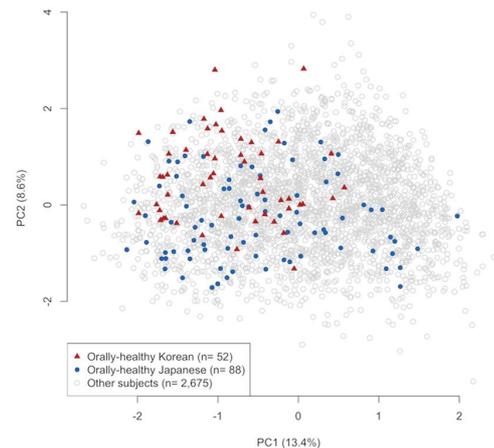


図 2. 図 1 においてバーコードパイロシーケンシング法を用いて解析を行った口腔の健康な被験者 140 名を異なる色のプロットで示した。

140 名の被験者の唾液中の細菌構成は T-RFLP 法に比べより詳細な情報を得ることができるバーコードパイロシーケンシング法を用いて解析を行った。被験者の 16S rRNA 遺

伝子 V1-V2 領域増幅断片混合検体に対し、次世代シーケンサー Roche 454 Genome sequencer により 850,867 リードの DNA 断片の塩基配列が解読され、そのうち 419,397 リード (平均リード長、333 ± 7 塩基) がクオリティチェックを通過した。これらの塩基配列は 97%以上の類似性を示す配列を同一菌種由来 (OTU) とみなすと、2,703 に分類された。140 検体全ての組み合わせについて細菌群集構成類似度指標 UniFrac を算出したところ、日本人および韓国人被験者は明らかに偏って存在していた (PERMANOVA、 $P < 0.001$)。

細菌叢の複雑さを示す α -diversity に関わる三つの指標 (検出菌種数、Phylogenetic diversity (検出される菌種の系統的幅の広さ)、Shannon diversity index (検出される菌種数と均等度を考慮した指標)) はいずれも日本人被験者でより高く、いずれも統計的に有意であった (表 3)。日本人被験者の唾液中の細菌構成は韓国人に比べより複雑であることが示唆される。

表 3. 両国被験者の唾液中の細菌群衆の α -diversity の比較

	久山町 (n = 88)	楊平郡 (n = 52)	P value
検出菌種数	127 ± 21	104 ± 19	< 0.001
Phylogenetic diversity	0.9 ± 1.5	9.5 ± 1.3	< 0.001
Shannon diversity index	3.6 ± 0.3	3.1 ± 0.3	< 0.001

各検体の解読リード数の違いを補正するために、それぞれの被験者由来の塩基配列から 1000 リードをランダムに選び、それによって α -diversity を算出した。有意差の検定には Student の t 検定を用いた。

菌門レベルではこれまでの他の研究同様、Firmicutes、Proteobacteria、Bacteroidetes、Actinobacteria、Fusobacteria の 5 菌門が細菌構成の大半を占めていた。これら 5 菌門以外では TM7、Spirochaetes、SR1、Tenericutes、Cyanobacteria、Planctomycetes といった菌門も検出されたがその構成比率は極めて小さかった。Firmicutes、Proteobacteria、Bacteroidetes、Fusobacteria、TM7 の構成比率については両集団間で有意な差が認められた。

菌属レベルでは 97 の菌属が検出され、そのうちの 73 菌属はどちらの国の被験者からも検出された。10 菌属 (Streptococcus、Neisseria、Veillonella、Prevotella、Fusobacterium、Haemophilus、Actinomyces、Gemella、Porphyromonas、Granulicatella) は 140 名全員から検出され、細菌群集全体の 86.0 ± 5.0% を占めていた。一方でそれらを含めた各菌属の構成比率は両国で大きく異なっていた。Neisseria をはじめとする 3 菌属の構成比率は、日本人に比べ韓国人において有意に高かった。一方、Veillonella、Fusobacterium、Prevotella、Gemella、

Granulicatella を含む 19 菌属は日本人でより優勢であった。

【考察】

我々は以前の T-RFLP 法とクローンライブラリー法を用いて行った研究において、歯周炎の被験者では歯周組織の健康な被験者に比べ Veillonella、Prevotella といった菌がより優勢であり、Neisseria、Haemophilus、Porphyromonas の比率が小さいことを報告している (Takeshita et al., 2009)。本研究の全被験者に対する T-RFLP 解析の結果においても口腔の健康な被験者では、Neisseria、Haemophilus、Porphyromonas といった菌がより優勢であり、Veillonella、Prevotella の比率が小さいことが示唆された。これらの結果から、韓国人被験者の細菌構成は日本人被験者に比べ「より健康な」パターンであるとみなすことができる。興味深いのはこの細菌構成の差異が口腔に全く問題のみられない被験者同士の比較においても認められたということである。すなわち、歯周組織の健康状態の悪化が細菌構成の差異を生んでいるとは考えにくい。唾液細菌叢の全体構成の安定性は 10 年の経時的変化を観察した最近の報告 (Stahring et al., 2012) や歯周治療を行いながら 2 年間観察したわれわれの報告 (Yamanaka et al., 2012) において明確に指摘されている。これらの結果を鑑みると、日本人の口腔常在細菌叢は韓国人に比べより歯周炎を引き起こしやすい構成を呈しており、それが日本人の歯周炎有病率の高さを反映していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 1) Fukui N, Shimazaki Y, Shinagawa T, Yamashita Y. Periodontal status and metabolic syndrome in middle-aged Japanese. J Periodontol 2012. 83:1363-71.
- 2) Takeshita T, Suzuki N, Nakano Y, Yasui M, Yoneda M, Shimazaki Y, Hirofujii T, Yamashita Y. Discrimination of the oral microbiota associated with high hydrogen sulfide and methyl mercaptan production. Sci Rep 2012. 2:215.
- 3) Shimazaki Y, Kushiyama M, Murakami M, Yamashita Y. Relationship between normal serum creatinine concentration and periodontal disease in Japanese middle-aged males. J Periodontol 2013. 84:94-9.
- 4) Furuta M, Shimazaki Y, Takeshita T, Shibata Y, Akifusa S, Eshima N, Kiyohara Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Mukai N, Nagata M, Yamashita Y. Gender differences in the association between metabolic syndrome and periodontal disease: the Hisayama Study. J

〔学会発表〕(計4件)

- 1) Shimazaki Y. Relationship between normal serum creatinine concentration and periodontal disease. Japan-China Dental Conference 2012. April 27, 2012 (Chengdu).
- 2) Fu B. Relationship between amount of stimulated saliva and oral health status:the Hisayama Study. Japan-China Dental Conference 2012. April 27, 2012 (Chengdu).
- 3) Yamashita Y. Comparison of oral health and environment between Korean and Japanese population. The 2012 Annual Meeting of Korean Academy of Oral Health (招待講演). Oct 26, 2012 (Seoul).
- 4) 竹下徹 .分子疫学的手法を用いた宿主の健康に関わる口腔マイクロバイオームの探索 第87回日本細菌学会(招待講演) .2014年3月26日(東京).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

九州大学・歯学研究科(研究院)・共同研究員 嶋崎 義浩
研究者番号: 10291519

(2)研究分担者

九州大学・歯学研究科(研究院)・教授
山下 喜久
研究者番号: 20192403

大分大学・医学部・教授

江島 伸興

研究者番号: 20203630

(3)連携研究者

()

研究者番号: