

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593130

研究課題名(和文)メタゲノム解析による細菌の全身への分布の解明と早産の予防

研究課題名(英文) Investigation of bacterial distribution in pregnant women by metagenomics analysis and prevention of adverse pregnancy outcomes

研究代表者

加藤 幸紀 (KATO, Satsuki)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：50281283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：妊婦の口腔内状態が早産・低体重児出産に影響する可能性がある。本研究は妊婦の口腔細菌叢と全身状態の関連性を明らかにすることを目的とした。妊婦と非妊娠女性を被験者として唾液を採取し、女性ホルモン量の定量と口腔細菌のメタゲノム解析を実施した。この結果、被験者の年齢構成と歯周組織検査結果には有意差はなかった。妊婦はプロゲステロン量が有意に高かったが、エストロゲン量に有意差はなかった。メタゲノム解析により、Bifidobacteriaceae目妊婦にのみ認められた。以上のことから妊婦の口腔内細菌の分布にプロゲステロンの影響やBifidobacteriaceae目の出現が関連すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have suggested that periodontal disease might be a risk factor for preterm birth and/or low birth weight. The aim of this study was to evaluate the association between oral bacteria and systemic conditions in pregnant women. Salivary samples were collected from pregnant women and non-pregnant women, and periodontal examination was performed. Concentrations of progesterone and estradiol were determined using ELISA. The bacterial DNA was isolated from saliva, and the bacterial composition of oral bacterium was investigated by 16S rRNA-based metagenomics analysis. It was found that progesterone levels in pregnant women were significantly higher than non-pregnant women. From 16S rRNA-based metagenomics analysis, Bifidobacteriales was only emerged in pregnant women. Periodontal status was not significantly different between pregnant women and non-pregnant women. These results suggest that Bifidobacteriales might be increased in pregnant women.

研究分野：歯周治療学

キーワード：メタゲノム解析 歯周病 妊娠女性 早産・低体重児出産

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症性疾患である歯周炎が様々な全身疾患に関わることは多くの疫学調査で明らかとなってきた(文献1)。早期低体重児出産の発症機構について Offenbacher らは歯周病原細菌感染によって産生されたプロスタグランジンが早産を促すというモデルを最初に提唱していたが、その後は TNF- α などの炎症性サイトカインの関わりも報告されており、発症を介在する分子について詳細は現在も明らかになっていない。

我々は代表的な歯周病原細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 菌のロイコトキシンが高い分子相同性を有することを初めて報告した。*A. actinomycetemcomitans* 菌は侵襲性歯周炎の病原細菌とされているが、口腔外感染症の原因菌としても注目を集めており、脳膿瘍のように本来細菌が存在しない臓器における重篤な感染例も数多く報告されている。これらのことから、これまで歯周病原細菌の感染については歯周炎局所だけでなく、遠隔臓器における感染も考慮する必要があると考えられる。

これまで我々は動脈瘤や動脈硬化症における歯周病原細菌の存在を報告してきたが(文献2、3)、歯周病原細菌の存在を確認するだけにとどまっており、歯周炎患者で良くみられる一時的な菌血症による細菌を検出しただけである可能性も否定できなかった。

早期低体重児出産と歯周炎の関係を明らかにするためには、妊娠女性の胎盤におけるあらゆる細菌の有無を網羅的に調べ、同一患者の口腔細菌、腸内細菌と比較することが必要であるという着想に至った。

これまでの歯周炎と全身疾患の研究では常に歯周病原細菌だけに着目して研究が行われてきたが、本研究では歯周病原細菌に限らずあらゆる細菌の有無を調べる手法としてメタゲノム解析を導入することとした。メタゲノム解析は、16S rRNA の中のあらゆる細菌に共通な配列をプライマーとして用いて PCR 法で増幅し、増幅産物を直接シーケンスにかける方法で、シーケンスデータを 16S rRNA のデータベースで検索することで菌を同定することができる。

2. 研究の目的

我々は歯周病と早産/低体重児出産との関わりに注目してきた。しかし歯周病原細菌の感染は歯周組織にとどまるのか、胎盤に達するのかについてはこれまで十分に明らかにされておらず、産科領域では近接する腸管の細菌の影響の方が大きいという認識も強い。

本研究では妊娠時の口腔内細菌叢の変化を網羅的に調べることを目的として、口腔細菌のメタゲノム解析を行い、検討を加えることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 被験者

妊娠 40 週までの妊娠女性と規則正しい月経周期(25~38 日周期)を有する女性を被験者とした。

(2) 唾液採取

女性ホルモン測定用: SalivaBio 社製 Saliva Collection Aid を用いた流涎法にて採取した。

メタゲノム解析用: DNA Genotek 社製 OMNigene・DISCOVER を用いて採取した。

(3) 女性ホルモン量の定量: 唾液中の女性ホルモン量は、Salimetrics 社製 Salivary Progesterone EIA kit と Salivary 17 β -Estradiol EIA kit を用いて、プロゲステロン量とエストロゲン量を定量した。

(4) メタゲノム解析: 採取した唾液から分離した DNA をテンプレートとして 16SrRNA の全細菌に共通する配列に対するプライマーを用いて PCR 法にて増幅後、得られた PCR 産物でメタゲノム解析を実施した。メタゲノム解析は北海道システム・サイエンス社に委託し、次世代シーケンサーとして Roche GS FLX を用いて Multiplex/ Amplicon 解析で行った。

(5) 歯周組織検査: 各被験者において、プロービングポケット深さ(PD)とプロービング時出血(BOP)の有無を、唾液採取時に検査した。

(6) 統計解析: 妊娠女性と非妊娠女性との間の比較解析は Mann-Whitney U 検定を用いた。

4. 研究成果

妊娠女性の平均年齢は 30.7 ± 2.1 歳で妊娠 14.7 ± 2.5 週であり、非妊娠女性の平均年齢は 28.3 ± 1.5 歳であり、有意差は認めなかった(表1)。

妊娠女性と非妊娠女性との間でポケット深さ、プロービング時の出血等の歯周組織状態に有意差はみられなかった(表1)。

	年 齢		妊娠週数	PD (mm)	BOP (%)
	1	2			
妊 娠	33	30.7±2.1	15	1.85±0.43	2.4
	30		12	2.15±0.47	16.1
	29		17	1.80±0.53	6.0
非妊娠	27	28.3±1.5		2.10±0.27	3.6
	30			2.07±0.49	3.6
	28			1.79±0.49	14.3

PD：フロービング深さ
BOP：フロービング時出血

表 1：被験者情報

妊娠女性では非妊娠女性に比べて唾液中のプロゲステロン量が有意に高かったが、エストロゲン量に有意差はみられなかった(図1)。

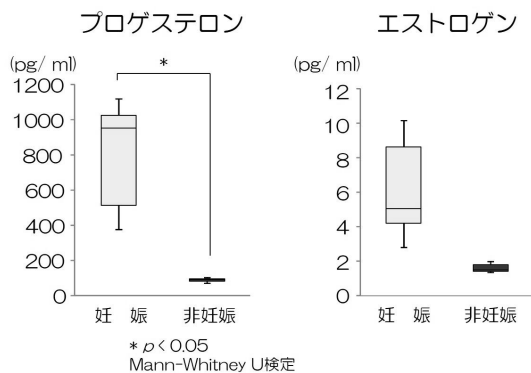


図 1：唾液中の女性ホルモン量の比較

メタゲノム解析の結果、12 門、20 綱、32 目、59 科、94 属、127 種の細菌種が検出された。

Bifidobacteriaceae 目の細菌は妊娠女性にのみ出現した(図2)。

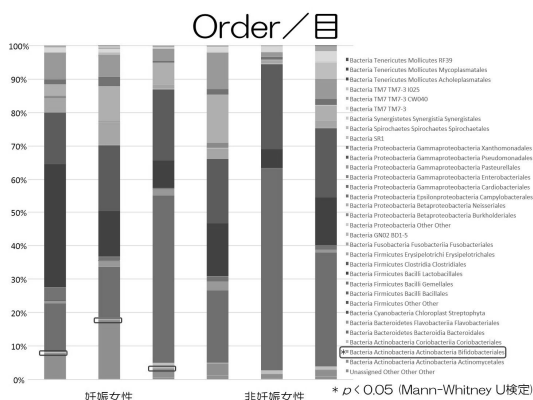


図 2：メタゲノム解析結果

以上のことから、妊娠女性の口腔内微生物叢の変化にプロゲステロンが関与する可能性が示された。また、*Bifidobacteriaceae* 目の細菌は、新生児の腸管内において出生後早期に多くを占め、新生児の感染防御や粘膜免疫系の発達に重要な役割を果たすことが知られている。今回の研究において、

Bifidobacteriaceae 目の細菌が妊娠女性にのみみられたことは、母親の口腔常在菌が腸内細菌叢形成に影響する可能性を示す所見と思われた。

<引用文献>

1. Nagasawa T et.al., Relationship between Periodontitis and Diabetes. 2010.
2. Sakurai K et.al., High incidence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection in acute coronary syndrome. Int Heart J. 2007 Nov; 48(6): 663-75.
3. Chen YW et.al., Periodontitis May Increase the Risk of Peripheral Arterial Disease. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2008 35(2): 153-8

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2件)

1. Nagasawa T, Shimizu S, Kato S, Nakatsuka Y, Kado T, Hidaka T, Shirai K, Mori M, Furuichi Y. Host-microbial co-evaluation in periodontitis associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection. Journal of Oral Biosciences, 56; 11-17, 2014. doi:10.1016/j.job.2013.10.002
2. Kato S, Nakashima K, Nagasawa T, Abiko Y, Furuichi Y. Involvement of Toll-like receptor 2 in apoptosis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-infected THP-1 cells. Journal of Microbiology, Immunology and Infection., 46: 164-170, 2013. doi:10.1016/j.jmii.2012.02.003

〔学会発表〕(計3件)

1. 加藤幸紀、長澤敏行、古市保志：妊娠女性における唾液のメタゲノム解析．北海道医療大学歯学会第 33 回学術大会、2015 年 3 月 7 日、札幌
2. 長澤敏行、清水伸太郎、加藤幸紀、門 貴司、日高竜宏、森 真理、古市保志：北海道在住の日本人家族から分離された JP2 タイプの *A. actinomycetemcomitans* の特徴．第 55 回春季日本歯周病学会学

術大会、2012年5月18日、札幌

3. 清水伸太郎、長澤敏行、門 貴司、日高
竜宏、加藤幸紀、森 真理、古市保志：
JP2型 leukotoxin promoter を有する *A.*
actinomycetemcomitans 菌の解析 . 第55
回春季日本歯周病学会学術大会、2012
年5月18日、札幌

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加藤 幸紀 (KATO, Satsuki)
北海道医療大学・歯学部・講師
研究者番号：50281283

(2)研究分担者

森 真理 (MORI, Mari)
北海道医療大学・歯学部・講師
研究者番号：30275490

長澤 敏行 (NAGASAWA, Toshiyuki)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号：90262203