

平成30年6月14日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15856

研究課題名(和文)健全プラーク育成アプローチの開発に向けた初期付着菌コンプレックスの統合的理解

研究課題名(英文)Understanding of dental plaque microbiota in the early stage

研究代表者

竹下 徹 (Takeshita, Toru)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：50546471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：デンタルプラークは歯面への限定された細菌の付着に始まり菌種増加、増殖および遷移を経て病原性を発揮する。本研究では口腔内に6時間装着したハイドロキシアパタイトディスク表面に形成されたプラークを網羅的細菌群集解析法を用いて分析し、初期プラーク細菌群集の理解を目指した。本研究により初期プラークの詳細な細菌構成が明らかになったのに加え、歯面への付着・増殖能が特に高いと予想される菌種が特定された。またう蝕と関連する初期プラークの特徴も明らかとなった。本研究の結果は口腔マイクロバイオーームをターゲットとした新たな口腔保健アプローチを構築していくうえで重要な基盤データとなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Dental plaque is a dynamic microbial biofilm of which the development begins with adherence of selected bacteria. This study aimed to understand dental plaque in the early stage. Plaque samples that accumulated on a hydroxyapatite disk for 6 hours were collected from the subjects using a hydroxyapatite disk and analyzed using an open-ended approach using bacterial 16S rRNA gene. This study revealed the detailed bacterial composition of dental plaque in an early stage and identified the predominant bacterial taxa with strong adhesion ability on tooth surfaces. The initial dental plaque associated with dental caries was also characterized. Our results would be an important basis for a development of an effective approach to promote oral health.

研究分野：予防歯科学

キーワード：初期付着細菌 デンタルプラーク マイクロバイオーーム 16S rRNA 口腔 う蝕

1. 研究開始当初の背景

デンタルプラークは歯面に形成される細菌の凝集塊であり、長期にわたる付着によりう蝕や歯周病を引き起こす。既にいずれの疾患についても病巣にみられる細菌種が明らかにされ、病原性プラークの特徴について多くの知見が得られている。しかしながら多様な形態をとる病原性プラークの細菌構成について確固とした定義を行うことは困難であり、治療や予防に有効なターゲットを絞り込めないことから実際の臨床応用にはあまり結びついていない。

デンタルプラークは初期付着菌コンプレックスの形成に始まり菌種増加、増殖および遷移を経て病原性を発揮する。しかしながらこれまでプラークの病原性の解明をその形成初期から追求した研究はなく、成熟に至る過程のどの段階から病原性プラークに分岐していくのかは明らかではない。最近、申請者らはプラークの成熟過程を7日間にわたり観察した際、う蝕経験のない被験者とう蝕経験歯数の多い被験者とでは形成初日から細菌構成に差異が認められることを明らかにした。この結果から「病原性プラークへの成熟の鍵は初期付着菌の組み合わせにあるのではないかと考え、初期付着菌コンプレックスに焦点をあてた本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

上記の背景から本研究では80名弱の被験者に6時間のハイドロキシアパタイトディスクの装着を依頼し、ディスク表面に形成された初期プラークの分析を行った。同時に採取した唾液や舌苔との比較や口腔状態との関連の検討から初期プラーク細菌群集の理解を目指した。

3. 研究の方法

本研究では九州大学に所属する40歳未満の学生もしくは職員に口腔細菌群集検体の提供を依頼した。研究計画については九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会において実施許可を受けた(許可番号28-127)。

(1) 口腔診査およびアンケート

対象者には本研究の内容を説明し研究参加への同意を得た後、口腔診査をおこなった。歯式を取得した後、歯周組織検査を各歯の頰側中央と近心に対して行い歯周ポケット深さの測定とプロービング時出血の有無を観察した。さらにOral hygiene indexを用いて歯垢と歯石の付着状況を評価した。加えて、アンケートにて口腔保健に関する生活習慣と全身状態についての情報を取得した。

(2) 口腔細菌群集検体の採取

初期プラークを採取するため、簡便に装着し6時間保持することができるハイドロキシアパタイトプレートを設計した(図1)。本プレートは直径9mmのハイドロキシアパタイトディスクをマウスピース作製のレジンプレートに埋入し円形に切り取った後、両端

を通したデンタルフロスを用いて小白歯部にくくりつけることで口腔内で保持することが可能である。対象者に日中このハイドロキシアパタイトディスクの装着を依頼し、6時間経過後に回収した。装着中は飲食を禁止した。取り外したディスク上に形成された初期プラークはリン酸緩衝液を用いて軽くゆすぐことで表面に付着した通過菌を取り除いた後、ディスクごとDNA抽出用ライシスバッファーを入れたマイクロチューブに入れて回収し、DNA抽出まで-80°Cにて保管した。



図1 初期プラーク採取用ハイドロキシアパタイトプレート。

各被験者からは唾液および舌苔についても採取を行った。唾液は2分間のガム咀嚼時の刺激唾液を採取し、500 µlを解析に用いた。舌苔は直径15mmの不織布を貼付した電動ブラシのヘッドの部分に回転させることで採取した。いずれの検体もマイクロチューブにて、DNA抽出まで-80°Cにて保管した。

(2) 口腔細菌群集検体の採取

回収した細菌群集検体については加温、リゾチームおよびアクロモペプチダーゼを用いて菌体を破壊した。フェノール・クロロフォルム処理ののちイソプロパノール沈殿を行い微生物群集DNAを回収した。これを鋳型としてPCR法を用いて細菌16S rRNA遺伝子V1-V2領域を網羅的に増幅した。プライマーにはシーケンス用のアダプター配列を付与した338Rプライマーとアダプター配列に加え8塩基のサンプル識別用タグ配列(192種類)を付与した8Fプライマーを用いた。異なるタグ配列をもつ16S rRNA遺伝子群を等濃度ずつ混合し、これを鋳型としてIon PGM Hi-Q OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific社)を用いてエマルジョンPCRを行い、シーケンス用テンプレートとした。シーケンスプレートは適切な濃度に希釈したのち、Ion PGM HiQ Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific社)を用いて次世代シーケンサーIon PGM (Thermo Fisher Scientific社)にて塩基配列の解読を行った。

得られた塩基配列はRスクリプトを用いて断片長、プライマー配列の有無等に基づきクオリティチェックを行い、高品質のリードのみを抽出した。タグ配列の情報に基づき全リードを各検体に割り振ったのち、UPARSEを用いて全リードをOperational taxonomic unit

(OTU, 解析操作上の菌種) に分類した。代表配列と Human Oral Microbiome Database の参照配列および RDP Classifier から各 OTU に該当する細菌種を推定し、各検体に含まれる各菌種の構成比率を算出した。

初期プラークについてはより高精度に細菌構成を決定するために、さらにロングリードシーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子全長の塩基配列解読を行った。プライマーには 1492R プライマーと 8 塩基のサンプル識別用タグ配列を付与した 8F プライマーを用いて初期プラークから抽出された DNA を鋳型として PCR 法を用いて細菌 16S rRNA 遺伝子全長を網羅的に増幅した。異なるタグ配列をもつ 16S rRNA 遺伝子群を等濃度ずつ混合し、これを鋳型として Pacbio Sequel (Pacific Bioscience 社) を用いて塩基配列の解読を行った。取得した塩基配列は R スクリプトを用いた断片長、プライマー配列の有無等に基づきクオリティチェックにより高品質のリードのみを抽出し、タグ配列の情報に基づき全リードを各検体に割り振った。UNOISE を用いて全リードから denoising したのち、代表配列に該当する菌種を Human Oral Microbiome Database の参照配列および RDP Classifier を用いて同定し、構成細菌種とその構成比率を決定した。

4. 研究成果

74 名の対象者(20-32 歳)の初期プラーク、刺激唾液および舌苔検体からは 16S rRNA 遺伝子 V1-V2 領域の高精度塩基配列 6845755 リードが得られ、568 の菌種レベル OTU に分類された。どの検体でも *Streptococcus*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Veillonella* といった口腔常在細菌属が高い割合を占めていた。

各検体の細菌構成の類似度関係を weighted UniFrac で評価し主座標分析の手法を用いて図示すると、初期プラークの細菌構成は唾液および舌苔とは明らかに異なっていることが示された(図 2)。このことから本研究で採取した初期プラークは単なる唾液に含まれる細菌の混入ではなく、独立した細菌群集であることが確認された。

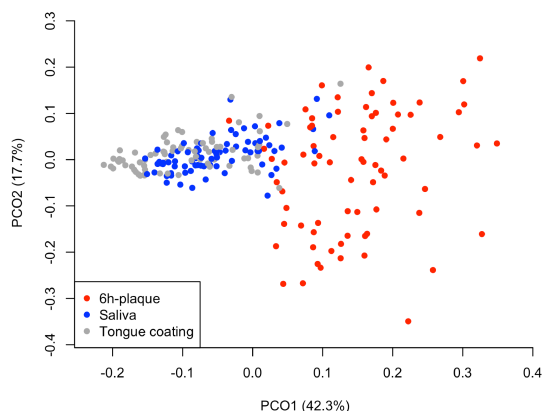


図 2 各検体の細菌構成の類似度関係 検体間の類似度を weighted UniFrac で評価し、主座標分析を用いて図示した。

初期プラークを構成する細菌種数は 113.8 ± 27.2 であり、唾液 (161.0 ± 25.0) と比べ有意に少なかった。このことからハイドロキシアパタイトが曝露している唾液の細菌種のうち、一部の細菌が選択的に付着していることが示唆された。

初期プラークを構成する主要な細菌種はどの被験者でもおおそ共通しており、90% 以上の被験者から検出された 26 の OTU (コア OTU) が各被験者の初期プラーク細菌群集の $81.7 \pm 10.0\%$ を占めていた。これら 26 菌種の検出率と初期プラーク、唾液での構成比率を表 1 に示す。これらコア OTU のうち、*Streptococcus mitis/pneumoniae*/sp. HOT-423 に該当する OTU, *Neisseria mucosa/sicca/pharyngis/flava* に該当する OTU, *Streptococcus sanguinis/tigurinus*, *Lautropia mirabilis* といった菌種に該当する OTU は唾液中での構成比率に比べ初期プラーク中において特徴的に高い割合を占めており、これらの菌が歯面への高い付着・増殖能をもつ可能性が示唆された。

表 1 初期プラークのコア菌種 (検出率 >80%) とそれらの初期プラークおよび唾液における構成比率

OTU番号	該当する菌種	検出率 (%)	構成比率 (%)	
			初期プラーク	唾液
OTU7	<i>Streptococcus mitis/pneumoniae</i> /sp. HOT-423	100	26.6±15.6	9.1±5.1
OTU4	<i>Neisseria mucosa/sicca/pharyngis/flava</i>	94.6	13.9±13.5	1.3±1.9
OTU20	<i>Streptococcus sanguinis/tigurinus</i>	100	3.0±3.1	0.4±0.3
OTU9	<i>Rothia aerea</i>	97.3	2.6±3.0	0.4±0.3
OTU10	<i>Lautropia mirabilis</i>	97.3	2.7±3.6	0.3±0.3
OTU491	<i>Rothia dentocariosa</i>	100	3.9±6.7	0.5±0.6
OTU282	<i>Haemophilus</i> sp. HOT-908	90.6	0.8±1.2	0.3±0.4
OTU32	<i>Gemella morbillorum/haemolysans</i>	97.3	2.4±3.3	1.1±1.0
OTU29	<i>Actinomyces</i> sp. HOT-175	93.3	0.9±2.0	0.1±0.2
OTU111	<i>Streptococcus</i> sp. HOT-423	93.3	0.4±0.7	0.1±0.2
OTU103	<i>Streptococcus oralis</i>	96.0	2.4±4.4	1.2±0.9
OTU50	<i>Streptococcus cristatus</i>	96.6	1.2±1.9	1.1±1.2
OTU2	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	100	6.0±6.6	6.4±3.3
OTU95	<i>Streptococcus australis</i>	96.0	0.8±2.0	1.2±1.3
OTU1	<i>Rothia mucilaginosa</i>	100	3.3±5.6	5.6±5.1
OTU11	<i>Streptococcus salivarius/vestibularis</i>	92.0	0.9±1.6	2.5±2.5
OTU47	<i>Bergeyella</i> sp. HOT-322	90.7	0.1±0.1	0.2±0.1
OTU12	<i>Porphyromonas pasteri</i>	94.7	1.1±2.1	3.8±2.9
OTU6	<i>Neisseria flavescens/subflava</i>	100	3.1±3.3	8.6±5.2
OTU3	<i>Fusobacterium periodonticum/nucleatum</i>	96.0	0.7±0.8	4.2±2.8
OTU13	<i>Veillonella rogosae/parvula/atypica/dispar/denticariosi</i>	98.7	1.0±1.9	4.7±2.5
OTU15	<i>Gemella sanguinis</i>	92.0	0.2±0.3	1.8±1.1
OTU5	<i>Granulicatella adiacens</i>	100	1.2±1.0	4.3±2.0

他の検体に比べ有意に構成比率が高い場合、赤で示した。

さらに、前述の解析では識別が困難な細菌種を同定するために 16S rRNA 遺伝子全長の塩基配列解読を行った結果、*S. mitis*, *Streptococcus* sp. HOT-423, *S. sanguinis*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *Rothia dentocariosa*, *Rothia mucilaginosa*, *Gemella haemolysans*, *Lautropia mirabilis* といった菌種が初期プラークの主要な構成細菌種であることが確認された。

さらに、初期プラークとう蝕経験との関連の有無について検討を行うために、う蝕経験歯数に基づき被験者を 3 カテゴリーに分け、初期プラークの細菌量および構成の比較を行った。定量 PCR 法で算出した直径 9 mm のディスクに付着した細菌量はう蝕経験歯数 0 歯の群 (20 名) および 1-7 歯の群 (36 名) と比較して、8 歯 (20 歳代の日本人の平均) 以上の群では有意に高く、う蝕経験の多い者

ではプラーク形成速度が速いことが示唆された(図2)。

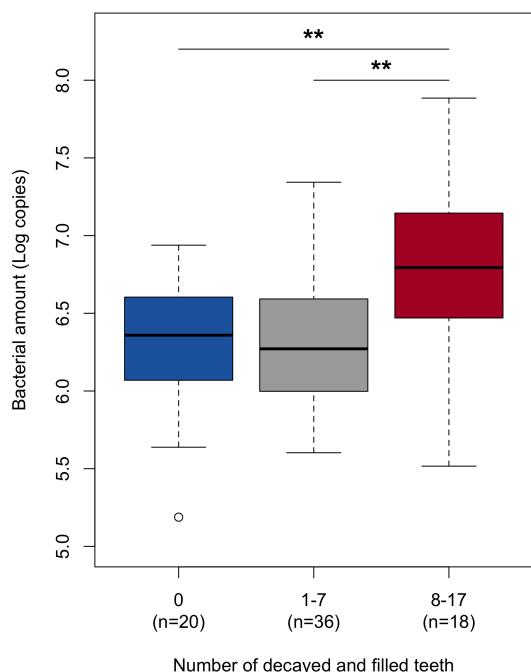


図2 初期プラークの量とう蝕経験歯数

一方で上記3群の細菌構成の類似度関係をUniFracで評価し主座標分析により図示を行ったところ(図3)う蝕経験の多い群および少ない群のいずれも主座標プロットにおいて偏りは認められず、細菌構成の全体像とう蝕経験の多寡とのあいだに強い関連は認められないことが示唆された。

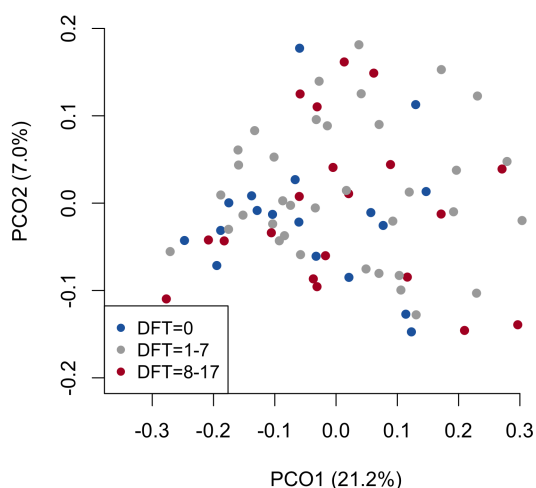


図3 初期プラーク検体間の細菌構成の類似度関係 検体間の類似度をweighted UniFracで評価し、主座標分析を用いて図示した。う蝕経験歯数(DFT)に従い、被験者のプロットを色分けした。

以上の結果からプラーク形成開始後6時間の時点ではう蝕経験の多寡にかかわらず、付着する細菌種とその構成は比較的共通していることが示唆された。ハイドロキシアパタイト上に形成されるペリクルに直接付着可能な細菌種は一部に限られることから、今回

の結果は妥当であるともいえる。一方で以前の我々の研究では形成開始後24時間の時点でう蝕経験のない者と多い者のプラーク細菌群集の構成に差異が認められていることから、6時間から24時間の間に付着しないし増殖する細菌のなかとう蝕と関連する細菌種が存在する可能性が考えられる。今後プラーク成熟過程の初期から中期への変化に焦点を当てる必要性が示唆された。一方で総細菌量には形成後6時間の時点でう蝕経験と関連した差異が認められた。この差異を生む唾液成分等の環境要因を特定することができれば、今後う蝕予防法の開発への応用につながると考えられる。

本研究により成人の初期プラークの細菌構成が詳細に明らかになったとともに、その主要な構成細菌種のなかでも特にハイドロキシアパタイト表面への付着・増殖能の高い菌種が特定された。加えて初期プラークとう蝕との関連についても様々な知見を得ることができた。本研究の結果は口腔マイクロバイオームをターゲットとした新たな口腔保健アプローチを構築していくうえで重要な基盤データとなると考えられる。

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3件)

1. Kageyama S, Takehita T, Furuta M, Tomioka M, Asakawa M, Suma S, Takeuchi K, Shibata Y, Yamashita Y. Relationships of variation of tongue microbiota and pneumonia mortality in nursing home residents. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 査読有, in press.
2. Kageyama S, Takehita T, Asakawa M, Shibata Y, Takeuchi K, Yamana W, Yamashita Y. Relative abundance of total subgingival plaque-specific bacteria in salivary microbiota reflects the overall periodontal condition in patients with periodontitis. *PLoS One*, 査読有, 12(4):e0174782, 2017.
3. Yamashita Y, Takehita T, The oral microbiome and human health. *J Oral Sci*, 査読有, 59 (2): 201-206, 2017

〔学会発表〕(計2件)

1. 竹下徹、井原由佳理、影山伸哉、松見理恵、山下喜久. デンタルプラーク形成に関わる初期付着細菌群の特定. 第91回日本細菌学会総会. 2018年3月27日-29日. ポスター発表. 福岡
2. 竹下徹. Dental plaque development on a hydroxyapatite disk in young adults observed by using a barcoded pyrosequencing. 第65回日本口腔衛生学会総会. 2016年5月29日. LION AWARD受賞講

演. 東京

〔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

竹下 徹 (TAKESHITA, Toru)
九州大学・歯学研究院・准教授
研究者番号：50546471

(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

()