

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10099

研究課題名(和文)デンチャープラーク微生物叢の真菌と細菌間相互作用に関わる分子種の探索

研究課題名(英文) Search for the molecules related to fungal-bacterial interactions in denture plaque microbiota

研究代表者

西川 清 (Nishikawa, Kiyoshi)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：50340146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：デンチャープラークに特徴的な細菌叢としてStreptococcus、Lactobacillus、Rothia、Corynebacteriumの4属を同定し、誤嚥性肺炎起炎菌群も高い構成比で検出されることを示した。またC. albicansと量的に正相関を示すプラーク構成細菌としてLactobacillus、Scardovia、Bifidobacteriumの3属、負相関を示す構成細菌としてLeptotrichia、Cardiobacterium、歯周炎関連菌のPorphyromonas、Peptococcusなどを同定した。更に偏性嫌気性細菌とカンジダの嫌気条件下での共培養法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デンチャープラークに特徴的な細菌叢の解明に加え、義歯が誤嚥性肺炎起炎菌群の温床となることをも定量的に示し、臨床現場で口腔と義歯のケアを同時に行うことの重要性を裏付けた。また、次世代シーケンス解析と定量的PCR解析を組み合わせて同一検体中の真菌と細菌の構成比を関連付ける手法を開発し、真菌-細菌間相互作用を対象とした微生物叢研究に役立つ定量的解析法の一例を提示した。さらにカンジダと細菌属の量的相関関係を手掛かりにしたカンジダ共生・拮抗細菌候補をスクリーニングする解析法の有効性と限界を示した。

研究成果の概要(英文)：The microbial compositions in denture and dental plaques were determined. Thirty denture and 16 dental plaque samples were collected from 18 denture wearers for DNA extraction. A meta 16S rDNA amplicon library was constructed and evaluated by high-throughput sequencing, followed by bacterial population analysis using QIIME2. The genera Streptococcus, Lactobacillus, Rothia, and Corynebacterium were more abundant in dentures than in dental plaques. The predominant bacteria causing aspiration pneumonia also inhabited the denture surfaces, suggesting that dentures may be important reservoirs of these pathogens. Further, bacterial genera correlated in relative abundance with C. albicans were identified. Three acidogenic bacteria were positively correlated, while Leptotrichia and periodontal pathogens negatively correlated with C. albicans. Bacteria showing negative correlations with C. albicans may be useful for controlling the growth of C. albicans in antifungal therapies.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：デンチャープラーク微生物叢 口腔常在細菌 カンジダ・アルビカンス 真菌-細菌構成比相関 次世代シーケンス解析 定量的PCR解析 誤嚥性肺炎 義歯ケア

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

義歯の表面に形成されるデンチャープラーク (DP) は天然歯表面で形成されるデンタルプラークと同様に口腔常在微生物から成るバイオフィームである。DP では真菌カンジダ属の検出率が高く、中でもカンジダ・アルビカンス種 (*C. albicans*) は、義歯性口内炎を含む口腔カンジダ症や免疫不全者に侵襲的な日和見感染症を起こす病原真菌として知られ、DP の主要な構成微生物としても古くから注目されてきた。*C. albicans* が多種多様な口腔細菌とプラーク内で共存している背景には何らかの真菌 - 細菌間相互作用の存在が示唆され、DP の微生物構成、さらにはバイオフィーム全体としての病原性にも影響を及ぼしていると考えられる。もしカンジダの増殖を抑える安全な拮抗細菌が見つければ、それをプロバイオティクスとして応用する等により、カンジダ症の予防と治療法選択の幅が広がるであろう。

近年登場した次世代シーケンサーを用いた解析法 (NGS) は、その並列処理能力の高さや簡便さによりヒトの微生物叢研究を一変させた。DP 細菌叢に関する NGS 解析例も 2015 年頃から報告され始めたが、それら先行研究が示す細菌構成の系統分類レベルは「綱」等の解像度が低いもので、臨床的にインパクトのある成果とは言えなかった。また、カンジダと細菌間の定量的な関連付けも出来ていなかった。NGS 菌叢解析の弱点は同一検体中の真菌と細菌をまとめて解析できないことである。その原因は、解析対象となるゲノムの標的配列が細菌では 16SrRNA 遺伝子であるのに対し真菌では 5.8SrRNA 遺伝子等と異なり、細菌と真菌に共通の PCR 用ユニバーサルプライマーが設計できないことにあり、これを克服するための解析法を新たに考案する必要があった。

2. 研究の目的

本研究の当初目的は、先ずデンチャーおよびデンタルプラーク構成細菌叢の特徴を網羅的な解析手段により少なくとも属レベルまで解像度を上げて解明すること () 次に で取得した細菌叢構成菌群の中からカンジダと共生または拮抗関係にある可能性が高い細菌属候補を、両者間の量的相関性の高さを手掛かりに絞り込むこと () そして で選択した低病原性細菌について *C. albicans* とのマクロな相互作用の有無、具体的には *C. albicans* の増殖抑制活性の有無を共培養系にて検討し () 増殖抑制活性有り判定された細菌種とカンジダ間で共培養時のみに働く遺伝子または分子種を分離・同定すること () であった。

3. 研究の方法

(1) プラーク試料の採取と DNA 抽出

本学附属病院補綴科外来に通院中の 65~88 歳の男女各 9 名計 18 名を被検者とし、デンチャープラークとデンタルプラークを合計 46 検体採取した (本学倫理委員会承認 No. 500)。デンチャープラーク 30 検体は、義歯研磨面では人工歯歯頸部から 15 検体を採取し、義歯粘膜面では残根やインプラントと接する部分などから 15 検体を採取した。また、デンタルプラーク 16 検体の採取部位は残存歯あるいはインプラント周囲とした。

少量のプラーク検体からカンジダを含めた全微生物のゲノム DNA を効率良く抽出するため、一般的な DNA 抽出試薬キットにジルコニアビーズを用いた破碎処理を追加した改良法を開発し、抽出・精製したメタゲノム DNA を以下の定量解析に用いた。

(2) メタ 16S ライブラリー調整、NGS 解析、細菌叢多様性解析

NGS の対象配列は細菌ゲノム 16SrRNA 遺伝子座の V3-V4 領域 460bp であり、前項で調製したメタゲノム DNA を鋳型にユニバーサルプライマー 341F/805R を用いた PCR 法にて一括増幅した。これに検体識別配列等を別途 PCR 法で付加したメタ 16S ライブラリーを調製後、イルミナ社の次世代シーケンサー MiSeq を用いて塩基配列を解読した。大量の塩基配列データの前処理と系統分類および構成比の算出には菌叢解析ソフト集合体の QIIME2 を用いた。まず類似度の非常に高い配列集団を同一種として 1 つのグループ (ASV) にまとめ、16SrDNA データベース greengenes に登録された既知配列データに対して相同性検索し、各検体中の構成細菌集団を属レベルまで分類した。細菌構成比は全 ASV の総リード数に対する属ごとのリード数の割合として算出し、更に義歯研磨面、粘膜面およびデンタルプラークの 3 群に分類したうえで多様性解析を行い、群間の細菌構成の類似性を検討した。

(3) リアルタイム PCR 法による *C. albicans* ゲノム定量と総細菌量との関連付け

絶対定量的リアルタイム PCR 法にてプラーク検体ごとに *C. albicans* 特異的 5.8S rDNA 領域 (CALB: 273bp) を定量し、同時にユニバーサルプライマー 341F/805R を用いて細菌の 16S rDNA V3-V4 領域 (460bp) の定量も行い、これを全細菌量とした。次に、下記に示す計算式を考案して定量値をモル比換算し、全細菌量に対して正規化した *C. albicans* 構成比を算出した。

$$C. albicans \text{ 構成比} = \frac{C. albicans \text{ 細胞数}}{\text{全細菌数}} = \frac{\text{CALB モル濃度}}{16S\text{V3V4 モル濃度}} = \frac{\text{CALB 定量値}/273\text{bp}}{16S\text{V3V4 定量値}/460\text{bp}}$$

(4) プラーク中の *C. albicans* と構成細菌属との量的相関関係の検討

(2)のNGS解析で算出された細菌属ごとの構成比と(3)で正規化された *C. albicans* 構成比との間の量的な相関性を検討するため、Spearman 順位相関係数検定を行った。

(5) 高い負相関性を示す低病原性細菌属の選定と *C. albicans* との共培養実験

前項(4)にて *C. albicans* に対し量的に高い負相関性を示した細菌属をカンジダ拮抗細菌候補と仮定し、その中でもヒトへの病原性が低い属を選定して、理化学研究所バイオリソース研究センターから入手可能な菌種を全て取り寄せた。これらと *C. albicans* の共培養が可能な培地や培養条件等を検討した後、同一固形培地上で共培養を行い、集落同士の接触阻害等マクロなレベルで *C. albicans* の増殖阻害活性が認められるか否かを観察した。

4. 研究成果

(1) デンチャープラークに特徴的な細菌構成の解明

全46検体を部位別の3群に分け、群ごとの細菌構成パターン解析と群間比較を行った(図1)。デンチャープラークはデンタルプラークよりも構成菌叢の多様性が有意に乏しいことが判った。義歯研磨面では、*Streptococcus*(レンサ球菌)、*Actinomyces*(放線菌)、*Lactobacillus*(乳酸桿菌)などグラム陽性通性嫌気性菌が優勢であった。義歯粘膜面では、*Veillonella*や *Prevotella*等のグラム陰性偏性嫌気性菌が義歯研磨面と比べて増加した。一方デンタルプラークでは *Fusobacterium*などの嫌気性グラム陰性桿菌の割合がデンチャープラークと比べて増加した。3群に共通して最も高い構成比を示した細菌属は *Streptococcus*で、上位10菌属中には、*Veillonella*、*Actinomyces*、*Lactobacillus*、*Prevotella*、*Leptotrichia*も共通して検出された。このうち *Streptococcus*、*Lactobacillus*、*Rothia*、*Corynebacterium*はデンチャープラークでデンタルプラークより高い比率を占め、逆に *Veillonella*、*Fusobacterium*、*Selenomonas*、*Prevotella*、*Porphyromonas*、*Campylobacter*はデンタルプラークでデンチャープラークより高い構成比を示した。つまり、メンテナンスで通院可能な有床義歯装着者のデンチャープラークを特徴づける主要細菌叢パターンとして、構成比が上位かつデンタルプラークよりも高比率を示した *Streptococcus*、*Lactobacillus*、*Rothia*、*Corynebacterium*の4菌属が挙げられる。

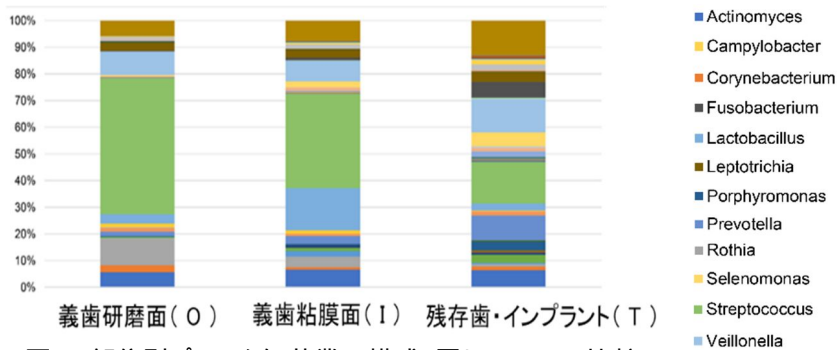


図1. 部位別プラーク細菌叢の構成(属レベルでの比較)

(2) デンチャープラークからの誤嚥性肺炎起炎菌群の検出と臨床的意義

近年、誤嚥性肺炎の起炎菌として口腔レンサ球菌属の重要性が報告され、嫌気性細菌属についてもラクタマーゼや病原因子の供給源として他の病原体による肺炎の重症化に關与している可能性があり、これら口腔常在菌から成るプラークが病原微生物のリザーバーとして全身疾患との関連において注目されてきている。つまり有床義歯と残存歯は全身疾患を起こす微生物を含んだバイオフィルムの温床になっており、デンチャーおよびデンタルプラークコントロールの重要性を再認識する必要がある。本研究でも、デンチャープラーク中に誤嚥性肺炎の起炎菌として注目される *Streptococcus*、*Corynebacterium*、*Veillonella*、*Prevotella*が高位構成比で検出された。このことから有床義歯の徹底した衛生管理を行うことが誤嚥性肺炎を含む重篤な全身感染症の予防につながると考えられる。

(3) プラーク採取部位とカンジダ構成比の関連

*C. albicans*は義歯研磨面(0群)では15検体全てから検出された。一方、義歯粘膜面(1群)では15検体中14検体(検出率93%)、デンタルプラーク(T群)では16検体中15検体(同94%)から検出された。前述の計算式より求めた *C. albicans* 構成比の平均値と標準誤差は、0群 0.308 ± 0.250 、1群 2.172 ± 2.046 、T群 0.375 ± 0.233 となり、群間に有意差は認められなかった(図2)。

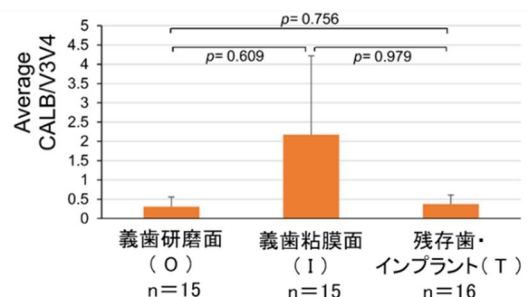


図2. 部位別 *C. albicans* 構成比平均値の比較

(4) *C. albicans* と量的に相関を示す口腔細菌属の同定

C. albicans に対し正相関を示した構成細菌属 (表 1)

部位別に解析を行った結果、義歯研磨面では有意に正相関を示した細菌属は認められなかった ($p < 0.05$)。一方、義歯粘膜面ではグラム陽性嫌気性桿菌の *Scardovia* が有意に正相関を示した。そして残存歯等のデンタルプラークでは、*Schwartzia*、*Scardovia*、*Atopobium*、*Megasphaera*、*Bifidobacterium*、*Veillonella* の嫌気性菌 6 属が有意に正相関を示し、デンチャープラークよりも正相関を示した細菌属が多く認められた。採取部位に関係なく全 46 検体を集計し解析したところ、グラム陽性でかつ乳酸産生菌である *Lactobacillus*、*Scardovia*、*Bifidobacterium* の 3 属が有意に高い正相関を示した。

採取部位	部位別順位	属名	相関係数rs	p値
義歯研磨面	1	Lactobacillus	0.3709704	0.16512
義歯粘膜面	1	Scardovia	0.625558	0.01925
残存歯 インプラント	1	Schwartzia	0.6538042	0.01134
	2	Scardovia	0.5843548	0.02362
	3	Atopobium	0.5612565	0.02972
	4	Megasphaera	0.5398254	0.03655
	5	Bifidobacterium	0.524649	0.04216
	6	Veillonella	0.5088235	0.04876
上記全体	1	Lactobacillus	0.4634056	0.00188
	2	Scardovia	0.4394831	0.0032
	3	Bifidobacterium	0.2981776	0.04547

C. albicans に対し負相関を示した構成細菌属 (表 2)

義歯研磨面ではグラム陰性通性嫌気性菌である *Lautropia* のみが有意に負相関を示した ($p < 0.05$)。義歯粘膜面では、グラム陰性嫌気性桿菌の *Leptotrichia* を筆頭に、*Lachnoanaerobaculum*、*Moryella* の 3 属が有意に負相関を示した。一方、デンタルプラークで有意に負相関を示した細菌属には嫌気性菌と好気性菌が混在しており、*Lachnoanaerobaculum* (嫌気性菌)、*Corynebacterium* (好気性菌)、*Cardiobacterium* (好気性菌)、*Paludibacter* (嫌気性菌) が $p < 0.01$ で、また *Leptotrichia* (嫌気性菌)、*Peptococcus* (嫌気性菌)、*Propionivibrio* (嫌気性菌) が $p < 0.05$ で有意に負相関を示した。このように、デンタルプラークの方がデンチャープラークよりも *C. albicans* と有意に負の相関を示す細菌属が多数認められた。全 46 検体を集計し改めて解析したところ、*Leptotrichia* を筆頭に、感染性心内膜炎起炎菌として知られる *Cardiobacterium* や辺縁性歯周炎関連菌の *Porphyromonas*、根尖性歯周炎関連菌の *Peptococcus* などが上位を占めた。

採取部位	部位別順位	属名	相関係数rs	p値
義歯研磨面	1	Lautropia	-0.5973743	0.02541
義歯粘膜面	1	Leptotrichia	-0.6362826	0.01728
	2	Lachnoanaerobaculum	-0.621921	0.01996
	3	Moryella	-0.5636318	0.03495
残存歯 インプラント	1	Lachnoanaerobaculum	-0.7897095	0.00222
	2	Corynebacterium	-0.7681214	0.00293
	3	Cardiobacterium	-0.7534632	0.00352
	4	Paludibacter	-0.6597383	0.01061
	5	Leptotrichia	-0.6106221	0.01803
	6	Peptococcus	-0.5900388	0.0223
	7	Propionivibrio	-0.5368755	0.03759
上記全体	1	Leptotrichia	-0.5094994	0.00063
	2	Cardiobacterium	-0.4753421	0.00143
	3	Lachnoanaerobaculum	-0.4283949	0.00406
	4	Porphyromonas	-0.4059137	0.00647
	5	Peptococcus	-0.3859037	0.00963
	6	Corynebacterium	-0.3813303	0.01053
	7	Catonella	-0.3613184	0.01536
	8	Capnocytophaga	-0.3487882	0.0193
	9	Paludibacter	-0.3363503	0.02405
	10	Propionivibrio	-0.3335928	0.02523
	11	Bulleidia	-0.3140657	0.03513
	12	Peptostreptococcus	-0.31288	0.03583

(5) レプトトリキア属とカンジダの嫌氣的共培養法の確立

相関検定で *C. albicans* に対して最も高い負相関性を示し、病原性も低いレプトトリキア属をカンジダの「拮抗細菌候補」として選定した。カンジダを含めた真菌は通常好気培養するが、共培養に選定した細菌が偏性嫌気性であったため、嫌気条件でも *C. albicans* が増殖可能な培地組成を種々検討した結果、理研から入手可能な 5 菌種 (*L.buccalis*, *L.goodfellowii*, *L.hofstadii*, *L.shahii*, *L.wadei*) と血液寒天培地上で共培養する方法を確立できた。しかしこれら 5 菌種いずれにも、*C. albicans* 集落の増殖阻害活性は観察できなかった (図 3)。

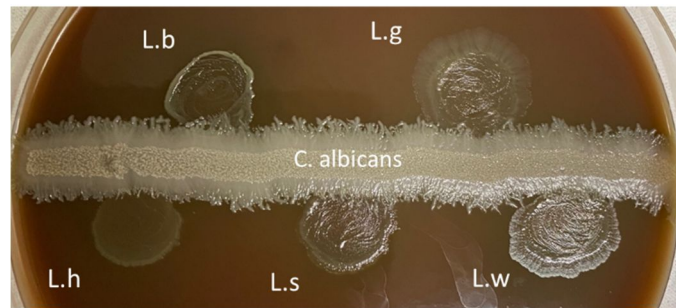


図3. 血液寒天培地上での *C. albicans* と *Leptotrichia* 5 菌種の嫌氣的共培養

(6) 今後の展望

本研究では「カンジダの増殖を抑制する拮抗細菌のブランク内構成比は、カンジダのそれに対して負の相関を示すはずである」との仮説を立て、定量解析データと相関検定の結果から真菌 - 細菌間相互作用に関わる分子の探索に用いる共培養細菌候補のスクリーニングを試みた。しかし、研究開始当時には NGS 解析で信頼性の高いデータが得られる限界レベルと考えられていた「属」のレベルに解像度を設定し菌叢解析を進めたものの、当初目的の「相互作用関連分子同定」まで到達するには結果的に不十分であった。レプトトリキア属総体として *C. albicans* に対し示した有意な負相関性は、拮抗細菌としてのカンジダ増殖抑制能を的確に反映したものではなかった可能性がある。QIIME2 による菌叢解析で標準設定されていた 16SrDNA 参照配列データベースは、収録配列の信頼性の高さで定評のある greengenes であった。しかし実際にそれを用いた解析の結果、多くの細菌属で種レベルまでの細かい分類ができておらず、更に配列データの更新自体が既に停止されて数年経過していることも後になって判明した。

そこで参照データベースを最新の HOMD や EzBio に変更して菌叢解析をやり直したところ、greengenes では属レベルまでが限界だった菌の多くが更に種レベルまで分類された。そしてレプトトリキア属について解析解像度を種レベルに上げた状態で相関検定をやり直したところ、理研から入手し共培養を行った前述の 5 菌種はいずれもカンジダに対する相関性が統計学的有意性に乏しい検定結果となった一方で、その他の入手不可能な同属未同定種の中に有意な負相関性を示す菌種が複数見出された。つまり、適切な 16S 参照データベースを利用して解析解像度を種レベルまで上げることにより、本研究で開発したスクリーニング手法が有用になる可能性は残されていると考える。

残念ながら補助期間内に当初の最終目的であった真菌 - 細菌間相互作用関連分子種の探索まで研究を進展させることはできなかったが、今後も引き続き「種」のレベルで再取得した菌叢解析データに基づく対カンジダ相関検定をやり直し、正負の量的相関を示す細菌種を新たに絞り込むことで、改めてカンジダ共生・拮抗細菌候補を明らかにしていきたい。

<引用文献>

Fujinami W, Nishikawa K, Ozawa S, Hasegawa Y, Takebe J: Correlation between the relative abundance of oral bacteria and *Candida albicans* in denture and dental plaques. *J Oral Biosci*, 63:175-183, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 武部 純、藤波和華子、尾澤昌悟、西川 清、長谷川義明	4. 巻 13
2. 論文標題 デンチャーブラークにおける細菌とカンジダ構成比の相関関係	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本義歯学会	6. 最初と最後の頁 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujinami Wakako、Nishikawa Kiyoshi、Ozawa Shogo、Hasegawa Yoshiaki、Takebe Jun	4. 巻 63
2. 論文標題 Correlation between the relative abundance of oral bacteria and Candida albicans in denture and dental plaques	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 175～183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2021.02.003	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 -
1. 著者名 藤波和華子、西川 清、尾澤昌悟、長谷川義明、武部 純	4. 巻 12
2. 論文標題 デンチャーおよびデンタルブラークにおける細菌とカンジダ構成比の相関関係	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本義歯学会誌	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 西川清、長谷川義明	4. 巻 72
2. 論文標題 デンチャーブラーク微生物叢の群衆解析と義歯ケア	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本歯科医師会雑誌	6. 最初と最後の頁 383-392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武部 純, 藤波和華子, 尾澤昌悟, 西川 清, 長谷川義明
2. 発表標題 デンチャーブラークにおける細菌とカンジダ構成比の相関関係についての検討
3. 学会等名 日本義歯ケア学会第13回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤波和華子, 西川清, 尾澤昌悟, 長谷川義明, 武部純
2. 発表標題 デンチャーおよびデンタルブラークにおける細菌とカンジダ構成比の相関関係
3. 学会等名 日本義歯ケア学会第12回学術大会
4. 発表年 2020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
研究協力者	藤波 和華子 (Fujinami Wakako)		

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
---------	---------