

令和 6 年 5 月 19 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10285

研究課題名（和文）口腔細菌叢のレジリエンスを指標とした口腔健康評価法の開発

研究課題名（英文）Development of oral health evaluation method using resilience of oral microbiota as an index

研究代表者

南部 隆之（Nambu, Takayuki）

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：80367903

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：口腔を対象とした細菌叢解析が広く行われるようになり、口腔や全身健康の悪化には、細菌叢バランスの変化が関連していることが明らかとなってきた。この変化が容易に起こるかどうかは、個人の細菌叢のレジリエンス（変化に対する抵抗力）に依存していると考えられているが、その評価法は未だ確立していない。本研究は、我々が構築した口腔内での細菌叢構成を維持したまま培養可能な細菌叢培養モデルと次世代シーケンシング技術を組み合わせることで、口腔細菌叢のレジリエンス評価を試みた。その結果、口腔細菌叢はpH6から7の間はレジリエンスを示すが、その範囲を外れると細菌叢変化（ディスバイオーシス）を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色は、本来in vivo（口腔内）で観察することが困難な細菌叢のレジリエンスを、我々が構築した口腔細菌叢培養モデルを用いることで、再現良く高精度に解析が可能な点である。また、本実験系では特定の細菌だけを追跡するのではなく、細菌共生の複雑系を残したままでの構成的な実験が可能となる新たな研究方法であるといえる。本研究により、変化しやすい口腔細菌叢（例えば、う蝕や歯周病タイプに変化しやすい細菌叢）の特徴が明らかとなり、最終的には、口腔における予防・治療の両面での個別化医療の開発に寄与できると考えられている。

研究成果の概要（英文）：With the widespread use of microbiota analysis targeting the oral cavity, it has become evident that changes in the balance of microbiota are associated with the deterioration of both oral and overall health. It is believed that the ease with which these changes occur depends on an individual's microbiota resilience, but a method for its evaluation has yet to be established. This study attempted to evaluate the resilience of oral microbiota by combining a microbiota culture model that maintains the composition of oral microbiota, which we have developed, with next-generation sequencing technology. As a result, it was revealed that the oral microbiota shows resilience within a pH range of 6 to 7, but outside of this range, it exhibits microbiota changes (dysbiosis).

研究分野：口腔細菌学

キーワード：口腔細菌 細菌叢解析 レジリエンス

### 1. 研究開始当初の背景

う蝕や歯周疾患などの口腔疾患患者に加え、高齢者や口腔状態が良好な被検者も含めた大規模な細菌叢解析が進められてきており、口腔や全身の健康と口腔細菌叢との関連性が明らかになりつつある。中でも注目すべきは、我々の口腔内には、う蝕、歯周病の病態を悪化させる口腔悪玉菌だけでなく、硝酸還元活性をもち血管の柔軟性を向上させる口腔善玉菌が存在すること、高齢者の肺炎関連死リスクと関連する口腔細菌叢が存在すること、エコタイプにもとづいて個人毎の口腔細菌叢をグループ化すると、う蝕や歯周疾患のハイリスクグループが存在したことである(図1)。つまり、口腔や全身健康の維持・増悪は、特定の細菌ではなく、口腔細菌叢のバランスの変動を伴った口腔環境の変化によって起こる可能性が高いことが示唆された。

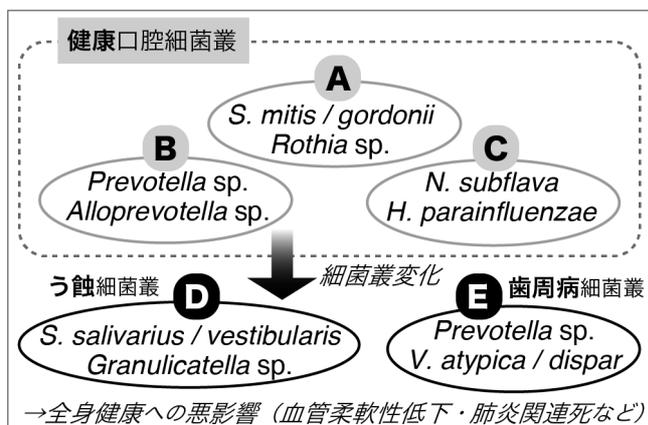


図1 ヒト口腔細菌叢のエコタイプに基づいた分類  
H, Haemophilus; N, Neisseria; S, Streptococcus; V, Veillonella.  
Zaura et al. (2017) ISMEJ, 11:1218-31. より改変

これらの背景より、我々のグループは独自に構築した細菌叢培養モデルを用いて、細菌叢バランスを疾患型から健康型へと変化させることができる因子や条件の探索を進めている。その実験過程で、使用サンプル毎に細菌叢の変わりやすさに差があることを確認した。これはレジリエンス(生態系の安定性の概念。細菌叢の変化に対する抵抗力との意味で使用)として近年注目されているもので、細菌叢変化に伴った疾患発症に深く関与していると考えられている(図2)。レジリエンス評価基準の構築が強く求められる中、我々は細菌叢培養モデルにて検証可能であることを見出した。

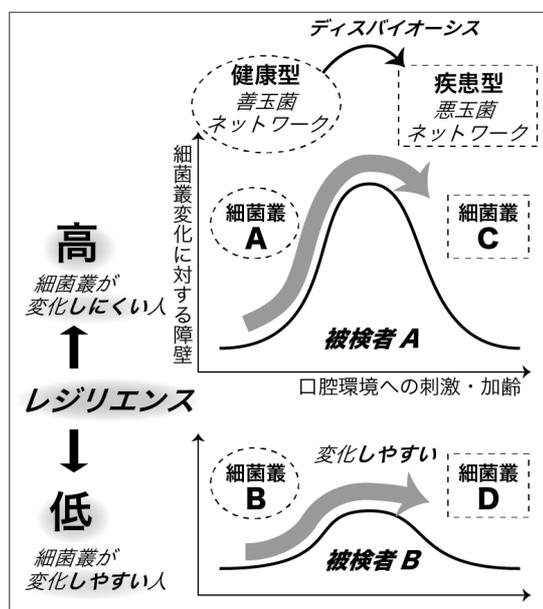


図2 細菌叢変化とレジリエンスとの関係  
参考: Rosier et al. (2018) J Dent Res, 97(4):371-80.

### 2. 研究の目的

本研究では、個人間の口腔細菌叢レジリエンスの差を生み出す要因と健康型と疾患型口腔細菌叢のレジリエンスの特徴を解明することを目的とし、我々が構築した口腔細菌叢培養モデル(図3)とメタ16S次世代シーケンス解析を組み合わせた高精度のin vitro解析を実施した。本研究は、本来in vivo(口腔内)で観察することが困難な細菌叢のレジリエンスを、我々が構築した口腔細菌叢培養モデル(図3)を用いることで、再現良く高精度に解析が可能である。この方法では、ヒト試験で問題となる飲食や生活習慣などのノイズの混入を排除し、条件を絞って細菌叢の変化を追うことが可能である。また、本実験系では特定の細菌だけを追跡するのではなく、細菌共生の複雑系を残したままの構造的な実験が可能となる新たな研究方法であるといえる。

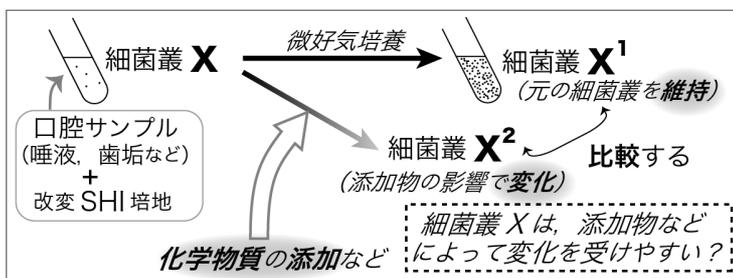


図3 我々が構築した口腔細菌叢培養モデル  
詳細は研究代表者の論文に記載: Nambu et al. (2019) Microorganisms, 7:353.

### 3. 研究の方法

同意の得られた口腔健康者(う蝕や歯周病をもたない若年成人、N=10)より、歯間プラークと

舌苔(これまでの研究で細菌叢が安定的に採取できることを確認)を採取し,滅菌 PBS 中に懸濁した. 改変 SHI 培地で 20 時間嫌気培養し,分注の後,-80 でグリセロールストックした. ストックサンプルを嫌気条件で 37 3 時間保温後,水溶性テトラゾリウム WST-8 を用いた Microbial Viability Assay Kit-WST (Dojindo) で迅速に総細菌数を揃え,改変 SHI 培地に添加した. リン酸緩衝液にて pH を変化させ (pH5.5~8), さらに改変 SHI 培地で培養した. 集菌,ジルコニアビーズを用いた細菌破碎,DNA 精製の後,16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を増幅し,次世代シーケンサー-MiSeq (Illumina) にて塩基配列の解読を行った. 本講座で構築している R スクリプトのワークフローを使用することで配列情報の統計解析を行い, pH 変化がレジリエンスに影響を与えているか検証した.

また,培養液に 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) を加えて培養し,集菌の後,LED 照射 (400 nm) による細菌叢変動についての解析を行った. DNA 操作や配列情報解析については,上で書かれた方法を用いた.

#### 4. 研究成果

##### (1) pH によるブランク細菌叢の変動

ヒトの飲食習慣や生活習慣,または局部及び全身の健康状態によって,口腔内 pH は可逆的に変化しうるが,その変化の詳細はほとんど明らかになっていない. 本研究は, pH 調整剤 (リン酸緩衝液) の添加により,口腔内菌叢と培養環境がどのように変化するのかを明らかにした. 具体的には,成人の研究対象者より採取した唾液と舌苔などの口腔サンプルを *in vitro* で培養し,生じた細菌叢の変化を次世代シーケンサーで詳細に解析した.

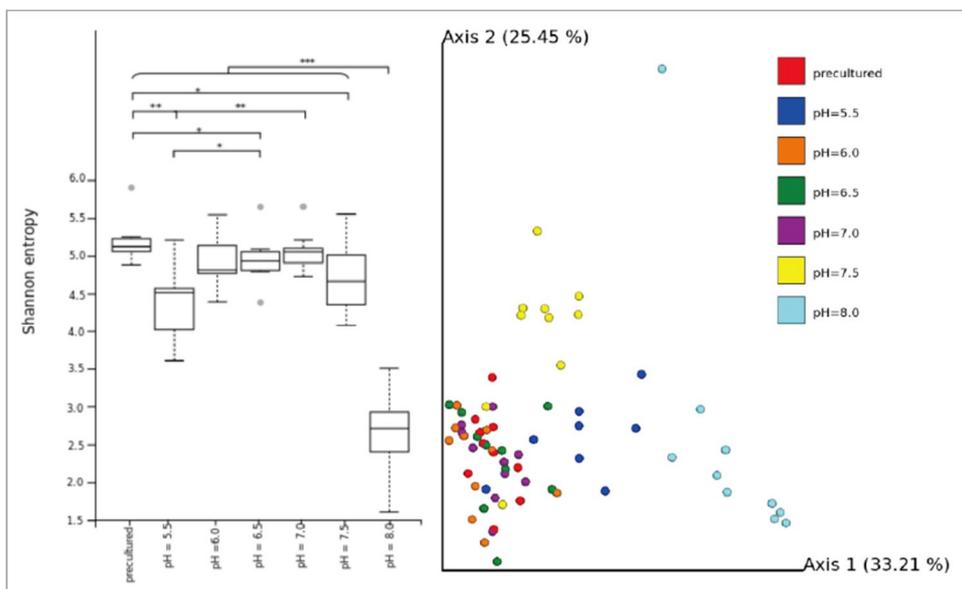


図4 pH 変化による  $\alpha$ ,  $\beta$  多様性

ブランク培養液の pH を 5.5 から 8.0 に調製し, 20 時間培養した. その結果, pH6.0, 6.5, 7.0 で培養した際は, 多様性と多様性とも元の細菌叢バランスを維持していた (図 4). 一方, pH5.5, 7.5, 8.0 で培養した場合, 多様性と多様性とも元の細菌叢とは異なった細菌叢バランスが観察された. これらの結果から, pH により細菌叢を維持できる能力が異なっていることが示唆された. 現在, 変化した細菌叢を pH7.0 の培養液で培養することにより, 元の細菌叢へと戻ることができるかを観察しているところである.

##### (2) 5-アミノレブリン酸による細菌叢の変動

5-アミノレブリン酸を併用した光線力学的療法 (ALA-PDT) は, 緑膿菌や黄色ブドウ球菌をはじめとした様々な細菌に対する殺菌効果として報告されている. 我々は ALA-PDT の口腔細菌叢に対する影響を調べることを目的とし, 5-ALA 濃度, 培養時間, 光強度を変化させてその菌叢変化を観察した. ALA-PDT は, *Fusobacterium nucleatum* および *F. periodonticum* に対して顕著な殺菌効果を示

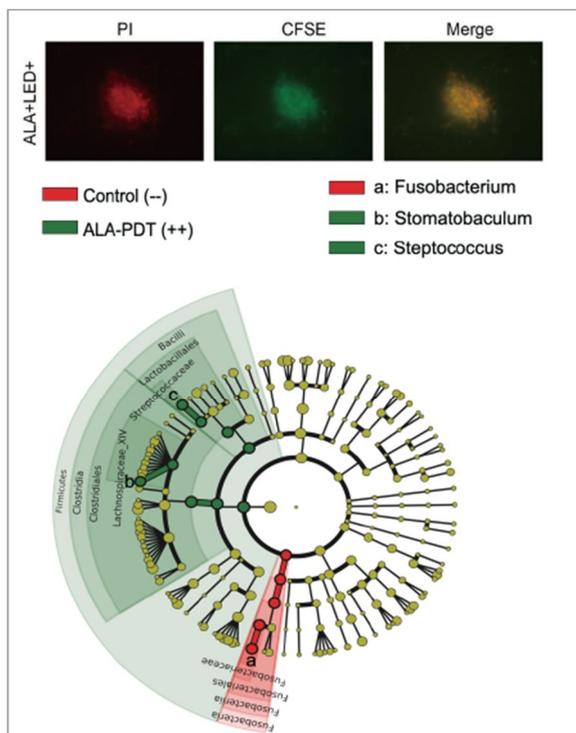


図5 ALA-PDT によるフゾバクテリウム殺菌

した(図5)。その殺菌活性は培養時間および光強度と正の相関を示した。微生物叢解析の結果、*Fusobacterium* 属の割合が顕著に減少したものの、ALA-PDT 群では  $\alpha$ -多様性に有意な変化は認められなかった(図6)。さらに、蛍光スペクトル分析から、*F. nucleatum* は5-ALA 添加後に興奮性の光感受性物質を産生することが示された(図6)。このことから、ALA-PDT は細菌叢の変動を誘発せず、特異的に *Fusobacterium* 属細菌の比率を減少させることが明らかとなった。

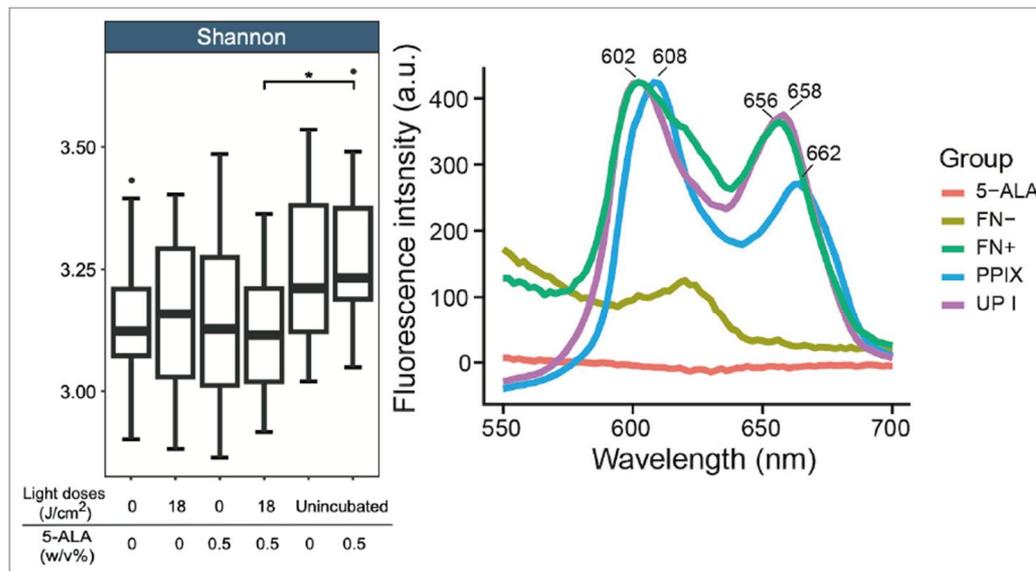


図6 ALA-PDT による  $\alpha$ 多様性変化とポルフィリン蓄積

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nambu Takayuki, Mashimo Chiho, Maruyama Hugo, Taniguchi Makoto, Huang Yao, Takigawa Hiroki, Kang Wenyan, Yan Qianqian, Zhang Lei, Yang Lin, Takahashi Kazuya, Okinaga Toshinori	4. 巻 11
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Actinomyces oris Strain K20, Isolated from an Oral Apical Lesion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e0054122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.00541-22	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 -
1. 著者名 Wang Dan, Nambu Takayuki, Tanimoto Hiroaki, Iwata Naohiro, Yoshikawa Kazushi, Okinaga Toshinori, Yamamoto Kazuyo	4. 巻 10
2. 論文標題 Interdental Plaque Microbial Community Changes under In Vitro Violet LED Irradiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 1348 ~ 1348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antibiotics10111348	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 Enomoto A, Nambu T, Kashiwagi K, Okinaga T, Baba S.	4. 巻 54
2. 論文標題 Impact of short term saliva storage at room temperature on the microbial composition.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Osaka Dent Univ	6. 最初と最後の頁 73-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18905/jodu.54.1_73	査読の有無 有
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 Maruyama H, Masago A, Nambu T, Mashimo C, Takahashi K, Okinaga T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Inter-site and interpersonal diversity of salivary and tongue microbiomes, and the effect of oral care tablets.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 F1000Res	6. 最初と最後の頁 1477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12688/f1000research.27502.1	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 Chao WANG, Takayuki NAMBU, Hiroki TAKIGAWA, Hugo MARUYAMA, Chiho MASHIMO, Toshinori OKINAGA	4. 巻 58
2. 論文標題 Effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on Fusobacterium periodonticum	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Osaka Dental University	6. 最初と最後の頁 219-226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18905/jodu.58.1_219	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 Chao Wang, Takayuki Nambu, Hiroki Takigawa, Hugo Maruyama, Chiho Mashimo, Toshinori Okinaga	4. 巻 256
2. 論文標題 Effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy against Fusobacterium nucleatum in periodontitis prevention	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology	6. 最初と最後の頁 112926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphotobiol.2024.112926	査読の有無 有
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 Wang Dan, Nambu Takayuki, Tanimoto Hiroaki, Iwata Naohiro, Yoshikawa Kazushi, Okinaga Toshinori, Yamamoto Kazuyo
2. 発表標題 Interdental Plaque Microbial Community Changes under In Vitro Violet LED Irradiation
3. 学会等名 第74回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黄堯, 南部隆之, 真下千穂, 円山由郷, 高橋一也, 冲永敏則
2. 発表標題 pHによる口腔細菌叢変化についての解析
3. 学会等名 第74回日本細菌学会関西支部総会
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
研究 分担者	高橋 一也  (Takahashi Kazuya)  (10236268)	大阪歯科大学・歯学部・教授   (34408)	
研究 分担者	真下 千穂  (Mashimo Chiho)  (80368159)	大阪歯科大学・歯学部・講師   (34408)	
研究 分担者	草野 薫  (Kusano Kaoru)  (80382498)	大阪歯科大学・歯学部・教授   (34408)	

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