

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890187

研究課題名（和文） 歯周治療が口腔フローラに与える影響の解明

研究課題名（英文） Effect of periodontal treatment on oral indigenous microbiota

研究代表者

竹下 徹 (TAKESHITA TORU)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：50546471

研究成果の概要（和文）：

本研究によって、唾液中の細菌構成は歯垢よりも舌苔により類似していることが明らかになった。さらに、従来の歯科治療、歯周治療は歯垢の細菌構成には大きな変化をもたらす一方で、唾液中の細菌構成には比較的影響を及ぼさず安定に保たれることが示された。唾液中の細菌構成の改善を目指すうえでは従来の治療に加え、常在フローラに直接作用する新たな手法を確立する必要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This investigation clarified that bacterial community structure in saliva is more similar to that of tongue coating rather than that of supragingival plaque. In addition, it revealed that bacterial community structure of saliva is stable in dental and periodontal treatment, while bacterial composition in supragingival plaque greatly alters. It is suggested that a novel treatment approach is needed for the improvement of bacterial community structure of saliva.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：予防歯科学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：口腔フローラ、16S rRNA、T-RFLP、歯周治療

## 1. 研究開始当初の背景

口腔における二大疾患といわれる齲蝕と歯周炎については、既に数種類の病原性細菌が特定され、その病原性因子についてこれまで様々な研究が行われてきた。一方で、これ

ら病原性細菌のみでう蝕、歯周病を説明するのは難しく、発症メカニズムはいまだ明らかになっていない。

口腔は多種多数の細菌が共生する一つの微生物生態系であり、口腔疾患における病原性細菌もその生態系の一員である。従って宿

主や生態系内の他の細菌との相互作用も疾患の発症において大きな役割を担っていることが推測される。我々は口腔感染症を理解するうえでは、個々の病原因子をもつ細菌だけでなく、取り巻く常在細菌について理解する必要があると考え、口腔フローラの全体像の把握を可能にする手法の開発を行ってきた。

従来、細菌の同定は培養を介して行われてきたが、細菌群集の全体像を把握するには膨大な時間と労力を要するだけでなく、培養条件が厳しいものは見落とししてしまうという問題があった。これに対し、細菌群集から直接抽出したDNAに含まれる16S rRNA遺伝子を解析する手法の開発は、そのような細菌を含めて比較的容易に構成を知ることが可能にした。本遺伝子はその塩基配列の多型性が系統解析に非常に有効であるうえ、配列内には原核生物においてほぼ完全に保存されている部位が存在する。この配列をプライマーとして設定したPCR法によってその環境中に含まれる細菌の16S rRNA遺伝子を網羅的に回収し配列情報を一つ一つ解読することで、その群集を構成する細菌を同定することができる。

この16S rRNA遺伝子の塩基配列解読に基づいた網羅的解析によって、様々な健康状態の被験者のプラーク、舌苔といった口腔細菌群集の全体像が次々と明らかになった。一方でその構成は想像以上に複雑であり、この手法で扱うことができるような少人数での比較解析では疾患や健康な口腔に特徴的な菌叢構成パターンの検出が困難であることも明らかになった。

我々は得られた16S rRNA遺伝子群をより迅速かつ簡便に分析する制限酵素切断末端断片長解析法 (Terminal restriction fragments length polymorphism; T-RFLP) に注目し、この手法に独自の改良 (断片長測定精度の向上) とコンピュータプログラムを用いたデータ解析系の構築を行うことで、大規模集団で細菌群集の全体像の把握が可能な解析法として確立した。さらに、歯科医院を受診した初診患者200名の唾液について細菌構成の比較解析を行い、常在細菌の構成パターンと歯周疾患の有病状況との間に関連がみられることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究では歯周組織の健康状態とのあいだに関連の認められた唾液中の細菌集団の由来についての検討を行ったうえで、その構成が歯周治療によってどの程度変動するものであるか、変動するのであればどのような

菌種に増減が認められるかについて明らかにすることを目指した。さらに、抗菌薬を併用し短期間でスクレーピング・ルートプレーニングを完了する Full mouth disinfection (FMD) 法を使用した場合についても検討を行った。

## 3. 研究の方法

唾液中の細菌の由来については、歯科医院を受診した38名の患者から採取した唾液、歯肉縁上歯垢、舌苔の三種類の検体を使用した。歯肉縁上歯垢は上顎右側1/2顎より、舌苔はマドラーを用いて舌背部より可及的に、唾液は3分間のパラフィン咀嚼時の刺激唾液を採取した。検体からDNAを抽出した後、T-RFLP法を用いて解析を行った。具体的には細菌に共通な配列である蛍光標識されたプライマー8F (5' - AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG -3') と806R (5' - GGA CTA CCR GGG TAT CTA A -3') を用いて16S rRNA遺伝子を増幅し、制限酵素HaeIIIで切断したのち、キャピラリー電気泳動を行い、細菌構成を菌種と菌量を反映したピークパターンとして表した。得られたT-RFLPピークパターンは誤差を考慮して分子量150以内に存在するピークは同一と見なしアラインメントを行った後、検体同士の類似度関係について考察を行った。

38名の患者のうち受診を継続し、歯周治療終了後メンテナンス期に入った21名の患者については再度唾液、歯肉縁上歯垢、舌苔の3検体を採取し、その変動量について検討を行った。治療前同様、縁上歯垢、唾液、舌苔のそれぞれからDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子を増幅した後、HaeIIIを使用してT-RFLP解析を行った。治療前後の変動率をBray-Curtis dissimilarity indexを用いて評価し、3検体間で比較を行った。

縁上歯垢は治療前後の菌叢構成の変化について検討を行った。縁上歯垢のT-RFLPピークパターンに出現した全てのピークについてそれぞれのピーク面積割合をStudentのt検定を用いて比較した。有意な差の認められたピークについては解析プログラムBP-TRFMAを用いて相当する菌種を検索した。

FMDを行った場合の菌叢構成の変化について検討するためにFMDを行った3名の患者から初診時とFMD終了後の唾液を採取した。DNA抽出、16S rRNA遺伝子群のPCR増幅の後、HaeIIIを用いたT-RFLP法を用いて解析を行った。治療前後の変動率をBray-Curtis dissimilarity indexを用いて評価し、通常の治療を行った場合と比較した。

#### 4. 研究成果

38名の患者それぞれから得られた唾液、縁上歯垢、舌苔の計114検体について、細菌群集の構成はT-RFLP解析を用いてピークパターンとして表された。主成分分析を行い、第一、第二主成分平面においてその類似度関係を示すと3種類の検体は明らかに偏って存在しており、それぞれの検体が固有の細菌構成であることが示唆された(図1)。この違いはAnalysis of similarity (ANOSIM)分析によって統計的に有意であることが確認された(表1)。

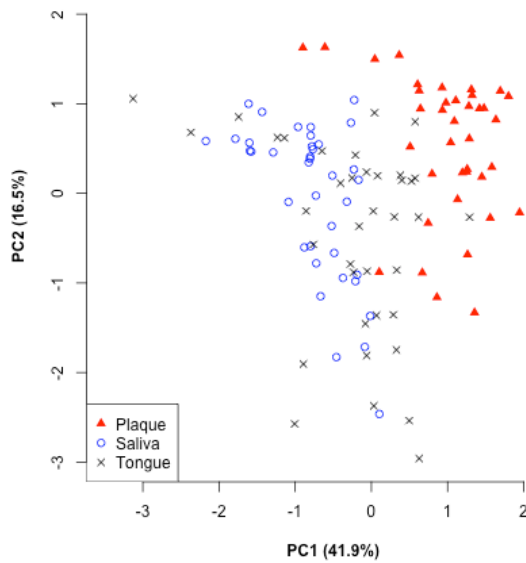


図1 治療前の114検体(38名、3検体)の類似度関係を示す主成分プロット

また、図から唾液中の細菌構成は舌苔により類似しており、縁上歯垢とは大きく異なっていることが明らかとなり、ANOSIMにおけるR値(2群の分布が異なっていれば1、一致していれば-1の値をとる)からもこのことは確認された。

	Statistical R	P-value
歯垢-唾液	0.73	< 0.001
歯垢-舌苔	0.68	< 0.001
唾液-舌苔	0.26	< 0.001

表1 検体間の類似度についてのANOSIM解析

38名の患者のうち受診を継続し、歯周治療終了後メンテナンス期に入った21名の患者については再度唾液、歯肉縁上歯垢、舌苔の3検体を採取し、T-RFLP解析を用いてそれぞれの細菌構成をピークパターンとして表した。主成分分析を用い計63検体間の類似度

関係を第一、第二主成分平面で示すと治療前の結果同様に3種類の検体が偏って存在し、唾液中の細菌構成が舌苔により類似し、歯垢とは異なっているものであることが示された(図2)。この違いについてもANOSIM分析において統計的に有意であることが確認された(表2)。

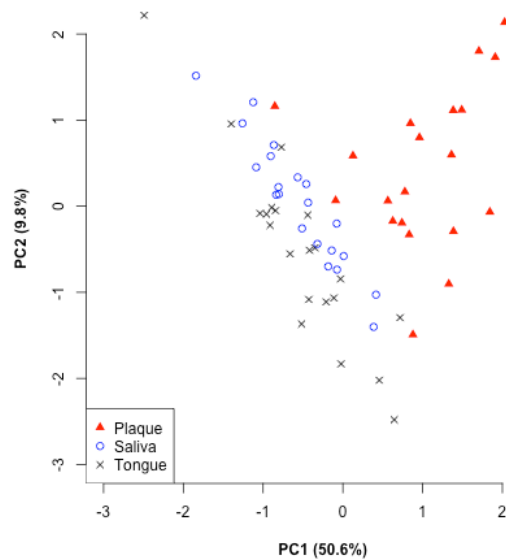


図2 治療後の63検体(21名、3検体)の類似度関係を示す主成分プロット

	Statistical R	P-value
歯垢-唾液	0.69	< 0.001
歯垢-舌苔	0.59	< 0.001
唾液-舌苔	0.24	< 0.001

表2 検体間の類似度についてのANOSIM解析

さらに、それぞれの検体の治療前後のT-RFLPピークパターンの変動をBray-Curtis dissimilarity indexで評価し、歯周治療による細菌叢構成の変化について検討を行った(図3)。

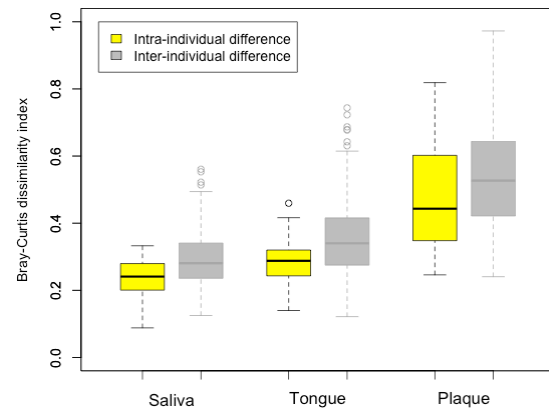


図3 治療前後のT-RFLPパターンの変動量

変動量を3検体で比較してみると(図中黄色)、縁上歯垢が大きく変化しているのに比べ、舌苔、唾液の変動量は有意に小さかった(P < 0.001)。さらに唾液のパターンの変化量は、他の被験者の唾液の T-RFLP パターンと比較した場合(図中灰色)、すなわち個人差と比べても有意に小さかった(P < 0.05)。治療を行うことで歯肉の炎症状態やポケット深さが改善し、歯垢の細菌構成が変化する一方で、唾液中の細菌構成は比較的安定に保たれていることが明らかになった。

治療によって歯垢中で変動が認められた細菌種を明らかにするために、出現した全てのピークについて治療前後のピーク面積比率を比較し Student の t 検定を行うと以下の10種類のピークに治療前後の有意な差が認められた(表3)。

断片長	治療前	治療後	P-value
F21454	9.1±5.4	16.3±12.5	0.01
F85165	4.1±4.5	1.2±1.5	0.01
F88691	5.2±2.7	2.3±3.2	0.00
F90429	0.8±0.7	0.0±0.2	0.01
F125126	0.1±0.2	0.0±0.0	0.04
F130261	0.2±0.4	0.0±0.0	0.04
R67487	9.3±5.4	5.5±5.6	0.04
R73221	0.0±0.0	0.3±0.4	0.00
R139201	7.3±4.1	3.9±3.9	0.01

表3 歯垢において治療前後で面積比率の異なるピーク(単位は%)

解析ソフトウェア BP-TRFMA で該当する菌種を検索すると、縁上歯垢においては治療によって *Fusobacterium*, *Leptotrichia* の比率が減少し、*Corynebacterium*, *Actinomyces* が増加していることが示唆された。

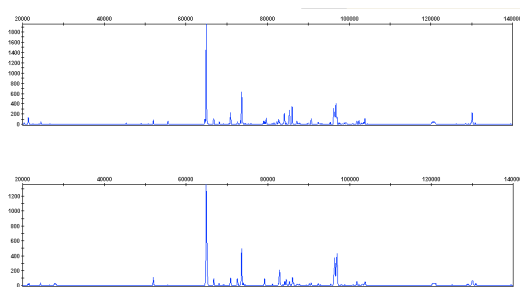


図4 FMD 治療前後の T-RFLP ピークパターンの一例(上が治療前、下が治療後)

抗菌薬を併用し短期間でスクレーリング・ルートプレーニングを完了する Full mouth disinfection (FMD) 法を使用した3名の被験者においても同様に唾液について T-RFLP

解析を行ったところ、通常の治療同様大きな変動は認められなかった(図4)。治療前後の変動を Bray-Curtis index を用いて評価したところ、0.12、0.15、0.21 と通常の治療を行った場合とほぼ同等であり、比較的安定に保たれていることが明らかになった。

本研究の結果から、FMD を含めた従来の歯周治療では歯垢の細菌構成は大きく変化する一方で、主に舌苔由来と考えられる唾液中の細菌群集はそれほどの影響を受けないことが明らかになった。一方でこのように安定な唾液中の細菌群集構成パターンと歯周組織の健康状態とのあいだに関連が存在するという事は、唾液中の細菌構成が口腔の現状というよりその人がもつ「罹患やすさ」に関連している可能性を示唆している。より大きな集団で経時的に口腔常在フローラと口腔の健康状態を追うことでこれらの関連を詳細に理解し、常在フローラに直接作用するような新たな治療アプローチを確立することができれば、悪化してから行う対症療法的なものではなく、より根本的な歯周病の予防・治療法の開発につながるのではないかと考えられる。

#### 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1件)

① Takeshita T, Suzuki N, Nakano Y, Shimazaki Y, Yoneda M, Hirofuji T, Yamashita Y. Relationship between oral malodor and the global composition of indigenous bacterial populations in saliva. Appl Environ Microbiol, 2010, 76: 2804-2814, 査読あり

[学会発表](計2件)

① Takeshita T, Kishikawa S, Yamashita Y. Sizing error in the T-RFLP analysis of 16S rRNA gene is dependent on the bacterial species. International symposium of Microbial Ecology, 2010年8月23日, Seattle, U.S.

② 竹下徹, 山中渉, 山下喜久 唾液中に認められる細菌種の由来についての検討 第83回日本細菌学会総会, 2010年3月27日, 横浜市