

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463249

研究課題名(和文) マイクロバイオーム解析による口腔常在フローラの成熟に関わる因子の探索

研究課題名(英文) Exploration of relevant factors of oral microbiome maturation by using molecular approach

研究代表者

竹下 徹 (Takeshita, Toru)

九州大学・歯学研究科(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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により乳幼児ではおよそ2歳までの間に舌苔マイクロバイオームの成熟に向けて細菌構成の大きな遷移が起こっていることが明らかとなった。特に生後200日付近で多くの被験児において常在細菌構成バランスの大きなシフトが認められており、この時期に行われた離乳食の開始が遷移開始の引き金となっている可能性が示唆された。本結果は健康な口腔マイクロバイオームの誘導する新しい形の口腔健康管理手法の構築を目指す上で礎となる重要なデータであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that compositional shift in tongue microbiome occurs during two years from birth. In particular, the relative abundances of dominant bacterial genera greatly changed after introduction of baby food (about 200 days from birth) in many of the subjects, implying that diet change would be a trigger of bacterial community succession. Our result would be the important basis for the establishment of a new approach for oral health promotion, which aims to induce healthy oral microbiome.

研究分野：予防歯科学

キーワード：口腔マイクロバイオーム 16S rRNA 舌苔 細菌

1. 研究開始当初の背景

人体には自身の細胞数の 10 倍を超える微生物が常在微生物叢 (マイクロバイーム) を構築し生息している。2000 年代になり DNA を用いた培養を介さない細菌群集解析法が確立されたことで従来極めて困難であったその全体像の把握が可能となり、特に腸管においてはマイクロバイームが宿主の健康に重要な役割を果たしていることが次々と明らかになってきた。

口腔は腸管とともに人体で最も複雑な常在フローラが構築されている部位の一つである。歯科の二大疾患であるう蝕と歯周病もこの口腔マイクロバイームを構成する細菌を引き金とするものであり、それぞれ *Streptococcus mutans* や *Porphyromonas gingivalis* をはじめとする数種の細菌種が病原細菌として同定され、その病原因子について数多くの知見が報告されてきた。一方でこれらの菌の存在が発症に必ずしも不可欠ではない、また存在していても必ず発症するわけでもないことから、疾患の発症には特定の病原細菌のみではなく口腔マイクロバイームを構成するさまざまな細菌の複雑な関与が指摘されるようになってきていた。したがって我々は口腔疾患の予防アプローチを開発していくうえで病原菌をとりまく多様な常在細菌を含めた口腔マイクロバイームの全体像、特にその動態についての理解が不可欠であると考えた。

このような状況を踏まえて、本研究では安定した口腔マイクロバイームが構築されるに至る過程、すなわち成熟メカニズムの理解を目指すこととした。腸管マイクロバイームでは無菌である胎生期から幼少期までのあいだに成熟・安定化しそれ以降は成長に伴いゆっくり変化していくと報告されている。一方で口腔マイクロバイームについては歯の萌出など特有のイベントが起こるにもかかわらず不明な点が多いままであった。次世代シーケンサーの登場により DNA を用いた培養を介さない網羅的細菌群集解析を多数の検体に対しても行うことが可能になったことから、乳幼児から発育に伴う多時点における口腔マイクロバイーム細菌構成の遷移を明らかにし、これを発育状態の変化と重ね合わせることで口腔マイクロバイーム決定に関わる要因の特定につながるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では次世代シーケンサーを使用し細菌 DNA を網羅的に解析する分子生物学的細菌群集解析法を用いて乳幼児の段階でみられる舌苔マイクロバイームの構成変化を明らかにし、その成熟に対して発育状態および生活様式の変化等の要因がどのように影響を及ぼすのかを明らか

にすることを旨とした。

3. 研究の方法

本研究では生後半年未満の子をもつ父母に対して研究内容を説明し、研究参加に対する同意が得たのち研究を開始した。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 25-110)。

(1) 舌苔検体の採取

検体の採取は対象児の父母に依頼した。500 μ l の DNA 抽出用ライシスバッファーをいれたマイクロチューブと綿棒を渡し、定期的に舌苔採取を行うよう指示した。舌苔の採取には綿棒で対象児の舌背中央部を 10 回程度擦過して行った。擦過した綿棒はチューブに入れ DNA 抽出用ライシスバッファーに浸したのち柄の部分で切断し蓋を閉じ、冷凍庫に入れて保存した。検体についてはある程度検体が蓄積し次第順次回収し、氷上にて九州大学歯学研究院口腔予防医学分野に移送した。

(2) 対象児の発育状況に関する情報の取得

口腔フローラの成熟に影響を及ぼす因子について探索するために保護者から対象児の発育状況および健康状態についての聞き取り調査を行った。

(3) 舌苔マイクロバイーム細菌構成の解析

回収した舌苔検体については遠心分離により綿棒から微生物群集を取得したのち綿棒を引き抜き、ジルコニア・シリカビーズを用いた加温破砕法で菌体を破壊した。フェノール処理、フェノール・クロロフォルム処理ののちエタ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 Template OT2 400 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解析言語 R を用いて断片長、クオリティスコア、プライマー配列の有無、ホモポリマーの有無に基づきクオリティチェックを行い、高品質のリードを選別した。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 Operational taxonomic unit (OTU, 解析操作上の菌種) に分類し、検出 OTU 数をはじめとする alpha diversity を算出した。各 OTU に該当

する細菌種は Human Oral Microbiome Database の参照配列および RDP Classifier を用いて推定し、各菌門、菌属、菌種レベル OTU の構成比率を算出した。

4. 研究成果

本研究では 13 名の乳幼児から採取した検体の細菌構成解析および発育状況に関する情報の取得を行った。それぞれの対象児の検体開始日（生後日数）、検体採取最終日（生後日数）および検体採取回数（解析に十分なシーケンスリードが得られなかったものを除く）を表 1 に示す。多くの対象児について生後半年程度から 2 歳前後までの期間の舌苔マイクロバイオームを採取・解析することができた。

表 1 各被験児からの検体採取回数

被験者番号	採取開始日	採取最終日	検体数
C1	63	1390	117
C2	86	394	34
C3	46	527	118
C4	151	431	41
C5	137	754	46
C6	46	527	119
C7	12	760	28
C8	118	380	36
C9	137	754	46
C10	79	203	18
C11	140	321	27
C12	169	296	8
C13	179	1026	39

各被験児の父母から聴取した発育状況に関する主な情報を表 2 に示す。C3、C5 および C9 の対象児は出生時低体重であった。授乳形態についてはほとんどの対象児が母乳のみないし混合ではあるが母乳を主とするものであり人工乳のみの者はいなかった。多くの被験児が 6 ヶ月前後に離乳食を開始しており、それに続いて歯牙の萌出が認められた。

表 2 各被験児の発育に関する主な情報

被験者番号	出生時体重	授乳形態	離乳食開始	歯牙萌出	外遊び増加
C1	2896g	母乳のみ	6ヶ月	9ヶ月	11か月
C2	2952g	母乳のみ	5か月	6か月	14か月
C3	2250g	混合(母乳>ミルク)	6か月	10か月	18か月
C4	2734g	母乳のみ	5か月	10か月	11か月
C5	1865g	混合(母乳<ミルク)	7か月	6か月	12か月
C6	2654g	混合(母乳>ミルク)	6か月	8か月	18か月
C7	2698g	母乳のみ	8ヶ月	9ヶ月	11か月
C8	2978g	混合(母乳>ミルク)	7か月	6か月	13か月
C9	1320g	混合(母乳<ミルク)	12か月	6か月	12か月
C10	3004g	混合(母乳>ミルク)	5か月	7か月	12か月
C11	3046g	母乳のみ	6か月	6か月	14か月
C12	3004g	混合(母乳>ミルク)	5か月	7か月	12か月
C13	3028g	母乳のみ	6か月	7か月	10か月

各被験児から採取した舌苔計 677 検体の細菌構成については Ion 318 v2 チップを用いた Ion PGM によるシーケンスランにおいて塩基配列データを取得し、それらを分析することで各検体に含まれる細菌種とそれぞれの構成比率を明らかにした。該当の 677 検体については 3000 リード以上のシーケンスリードを取得することができたことから細菌構成に関する詳細なデータが得られたといえる。

舌苔マイクロバイオームの細菌構成についてはいずれの被験児においても明らかな経時変動が認められ、腸管同様舌苔マイクロバイオームについても 0~2 歳のあいだが大きく遷移が起こる時期であるということが確認された。特にいずれの被験児においても 200 日前後が細菌属の構成比率分布において大きな変動が認められる時期であることが明らかとなった。図 1 に示す通り 200 日以前の舌苔マイクロバイオームは *Streptococcus*、*Rothia* および *Actinomyces* が細菌構成の大勢を占めるシンプルな構成であるのに対し、それ以降では *Neisseria*、*Veillonella*、*Fusobacterium*、*Granulicatella*、*Prevotella* といった細菌も高い構成比率を占めるようになることから 200 日前後に舌苔マイクロバイオームの遷移・複雑化におけるなんらかのトリガーが存在することが推察された。

生後 200 日付近ではほとんどの被験児に離乳食が導入されており、母乳・人工乳のみから固形食を口にするようになった食生活の変化が舌苔マイクロバイオームの遷移の開始に関わる重要な要因になっている可能性が示唆された。歯牙の萌出については離乳食の開始とほぼ同時期ではあるが、C1、C3、C4 のように歯牙の萌出が離乳食導入より 3 ヶ月以上遅い被験児でも同様の変化がみられていることからこの変化の開始に関わる要因としては歯牙の萌出よりも離乳食の開始である可能性が高いと考えられる。とはいえ、離乳食の導入が 12 か月と他の被験児に比べ遅かった C9 の被験児でも 200 日付近での遷移は認められており、離乳食開始とマイクロバイオーム遷移の関連性については今後さらなる検討が必要であると考えられる。

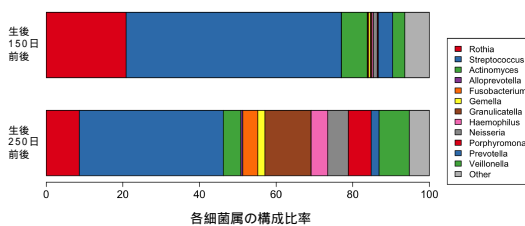


図 1 生後 150 日前後の検体（最も 150 日に近いもの）および生後 250 日前後の検体（最も 250 日に近いもの）における主要な細菌属の構成比率 250 日前後の検体のない被験者（C10）を除く 12 名の平均を示した。

検出 OTU 数をはじめとする細菌群集構成の複雑さを示す alpha diversity 指標は、ほとんどの被験者で観察期間内において時間の経過とともに増加していく傾向が認められた。一方で、長期にわたり検体採取が行われた被験者においては図 2 に示すように 500 日付近で増加が頭打ちになる傾向も認められ、2 歳付近までにはある程度舌苔マイクロバイオームを構成する細菌の新規定着が完了している可能性が示唆された。一歳を超えると一

人歩きが可能になり表2にあるとおり外遊びも開始される。さまざまな環境中の細菌に触れることで定着可能な菌のほとんどはこの時期に定着するものと考えられる。

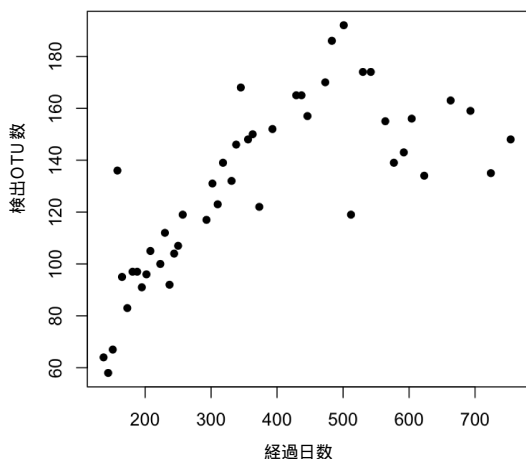


図2 発育に伴い認められる舌苔マイクロバイオームの菌種数の増加の一例 (被験者 C9)

本研究の対象児には一卵性双生児および二卵性双生児が一組ずつ含まれていた。我々は遺伝的要因の影響の有無について検討を行うため、同一の日に採取した検体間の細菌構成の類似度を評価し、一卵性双生児と二卵性双生児のどちらのほうが類似性が高いか検討を行った。図3に示すとおり一卵性双生児間では二卵性双生児間に比べ明らかに非類似度が低い、すなわち類似しており、遺伝的により近い一卵性双生児のほうが舌苔の細菌構成が類似していることが明らかとなった。もちろん二卵性双生児のほうが発育状況や抗生薬をはじめとする生育環境が異なっていた可能性もあり、検体数を増やした詳細な検討が必要であるが、口腔マイクロバイオームの決定に対する遺伝的要因の関連を示唆する結果であるといえる。

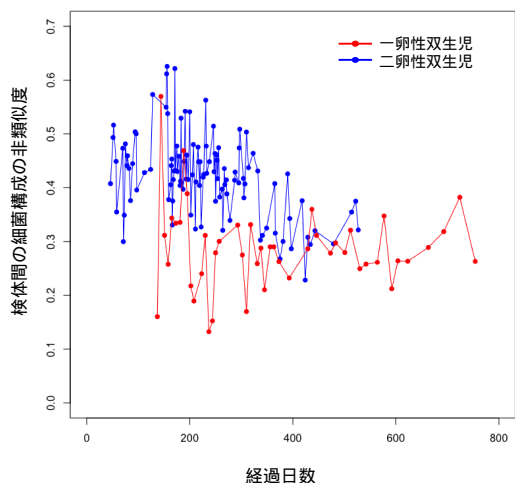


図3 一卵性および二卵性双生児の同一日に採取した舌苔の細菌構成の類似度

本研究により生後およそ2年のあいだに

舌苔マイクロバイオームの成熟に向けた遷移が起きていることが明らかとなった。特に200日付近では多くの被験児において大きな変化が認められており、この時期に行われる離乳食の開始が変化のトリガーとなっていることが示唆された。さらに双生児間の比較から遺伝的要因の関連の可能性も示唆する結果となった。本結果は健康な口腔マイクロバイオームの誘導する新しい形の口腔保健管理手法の構築を目指す上で礎となる重要なデータであると考えられる。

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10件)

Takeshita T, Yasui M, Shibata Y, Furuta M, Saeki Y, Eshima N, Yamashita Y Dental plaque development on a hydroxyapatite disk in young adults observed by using a barcoded pyrosequencing approach. *Sci Rep*, 2015, 5, 8136; DOI:10.1038/srep0816, 査読有。

Takeshita T, Matsuo K, Furuta M, Shibata Y, Fukami K, Shimazaki Y, Akifusa S, Dong-Hung Han, Hyun-Duck Kim, Yokoyama T, Ninomiya T, Kiyohara Y, Yamashita Y Distinct composition of the oral microbiota in South Korean and Japanese adults. *Sci Rep*, 2014, 4, 6990; DOI:10.1038/srep06990. 査読有

Obata J, Takeshita T, Shibata Y, Yamanaka W, Unemori M, Akamine A, Yamashita Y Identification of the microbiota in carious dentin lesions using 16S rRNA gene sequencing *PLoS ONE*. 2014, 9(8):e103712.doi:10.1371/journal.pone.0103712 査読有

Nakano Y, Takeshita T, Kamio N, Shiota S, Shibata Y, Suzuki N, Yoneda M, Hirofujii T, Yamashita Y Supervised machine learning-based prediction of oral malodor based on the microbiota in saliva samples. *Artif Intell Med*. 2014, 60(2):97-101 査読有

Moritani K, Takeshita T, Shibata Y, Ninomiya T, Kiyohara Y, Yamashita Y. Acetaldehyde production by major oral microbes. 2015, *Oral Dis*, 21(6):748-54. 査読有

Zakaria MN, Takeshita T, Shibata Y, Maeda H, Wada N, Akamine A, Yamashita Y Microbial community in persistent apical periodontitis: a 16S rRNA gene clone library analysis. *Int End J*, 2015, 48, 8, 717-728 査読有

山下喜久, 竹下徹 口腔マイクロバイオームと疾患との関連 *臨床と微生物*, 42(6) 711-715 (2015)

山下喜久, 竹下徹 口腔マイクロバイオーム評価の臨床的意義 *臨床化学*

44:290-297 2015

Takeshita T, Kageyama S, Furuta M, Tsuboi H, Takeuchi K, Shibata Y, Shimazaki Y, Akifusa S, Ninomiya T, Kiyohara Yamashita Y. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama study. Sci Rep, 2016 6, 22164; doi10.1038/srep22164. 査読有

⑩竹下徹、山下喜久 口腔常在微生物叢の構成と健康との関連 日本乳酸菌学会誌、第27巻、第1号、3-9、2016年3月査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

竹下徹、小幡純子、坪井秀憲、山下喜久 乳幼児期における口腔常在フローラの成熟過程 第38回九州口腔衛生学会総会 2013年10月27日、岐阜市

Takeshita T, Obata J, Tsuboi H, Yamashita Y Development of oral indigenous microbiota in early childhood ISME 15, Seoul, South Korea

Takeshita T, Furuta M, Tsuboi H, Kageyama S, Shimazaki Y, Ninomiya T, Kiyohara Y, Yamashita Y. Bacterial diversity and community types in saliva and oral environment. 5th International Human Microbiome Congress, 2015年4月1日. Luxembourg, Luxembourg.

Takeshita T, Yamashita Y. A Molecular epidemiology study exploring oral microbiome structure associated with human health. 歯科基礎医学会サテライトシンポジウム 2015年9月11日、新潟市

竹下徹 疾患および健康に関連する口腔常在マイクロバイオームの探索 日本乳酸菌学会秋季セミナー、2015年11月27日、東京

Takeshita T, Yamashita Y. Salivary microbiome and environmental conditions in the oral cavity. 第63回国際歯科研究学会 JADR、2015年10月31日、福岡

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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・大学院歯学研究院・准教授

研究者番号: 50546471

(2) 研究分担者

山下 喜久 (YAMASHITA, Yoshihisa)

九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号: 20192403