

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463165

研究課題名(和文) 口腔マイクロバイオーム解析に基づく新規口腔ケア指針を確立するための基盤的研究

研究課題名(英文) Establishment of the novel oral health care guidelines based on oral microbiome analysis

研究代表者

山中 渉 (Yamanaka, Wataru)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：20726228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：14名の歯周病患者から歯周治療前後に採取した唾液、舌苔、縁上プラーク、縁下プラークの細菌構成を調べた。歯周治療前後とも、唾液と舌苔の細菌構成の類似度は唾液と縁上プラークの細菌構成の類似度ならびに縁上プラークと舌苔の細菌構成の類似度に比べて有意に高かった。さらに、歯周治療前後において、縁上プラークの細菌構成が大きく変化したのに対し、唾液と舌苔はともに細菌構成の変化量が有意に小さく、主要な菌種の治療前後における変化も類似していた。以上の結果から、唾液の細菌群集が舌苔由来である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Saliva (SL), tongue coating (TC), supragingival plaque (AP), and subgingival plaque (BP) samples were collected twice from 14 patients with periodontitis who visited a dental clinic at their initial visit (pre-therapy samples) and after periodontal therapy (post-therapy samples). A principal coordinate analysis (PCoA) plot demonstrated that SL microbiota was distinct from both BP and AP microbiota, but closely similar to TC microbiota both pre- and post-therapy. Temporal variation following therapy in the SL and TC bacterial population was significantly smaller than in the AP microbiota, and relative abundances of the predominant bacterial species changed similarly in the SL and TC microbiota. These results suggested that the SL microbiota might originate from the TC microbiota.

研究分野：予防歯科

キーワード：唾液 細菌叢 舌苔 プラーク 歯周病

1. 研究開始当初の背景

唾液中の細菌構成は健康に關与する口腔環境を把握する上で有効な試料であり、唾液中の細菌構成のパターンが肥満や膵臓疾患などの全身の健康に關連していることが報告される一方で、我々も *Prevotella* 属と *Veillonella* 属が優勢な細菌構成が高齢者の発熱や肺炎のリスクに密接に關連することを明らかにしている(文献1)。また、唾液中の細菌構成と歯周疾患との關係を調べた我々の研究結果では、唾液中に *Prevotella* 属と *Veillonella* 属が優位なグループは他の群に比べて歯周ポケットならびに歯肉出血部位が多く存在していた。一方、*Prevotella* 属と *Veillonella* 属が少なく、*Neisseria* 属と *Haemophilus* 属が優位なグループは歯周ポケットがない人が半数以上存在し、他の群に比べて歯周組織が比較的健康的であった。これらの結果から、唾液中の細菌構成が歯周疾患の病態と密接に關わっているとともに健康的な歯周組織を持つ人々に特徴的な唾液細菌構成が存在すると考えられる(文献2)。このような唾液中の細菌構成は何に由来し、どのようにすればコントロールできるのであるか?そこで、申請者は歯周病の基本治療の前後で唾液細菌構成が変化するかについて調べた結果、唾液の細菌構成は歯面のプラークコントロールではほとんど変化しないことが明らかとなった(文献3)。これらの結果は、従来の歯面プラークのみをターゲットにした口腔清掃では健康的な唾液細菌構成からなる良好な口腔環境を構築できないことを示している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、健康的な唾液細菌構成を確立するために、唾液の細菌構成の由来を明らかにすることである。歯周治療前後の唾液の細菌構成と唾液以外の口腔細菌叢(舌苔、プラークなど)の細菌構成を調べ、歯周治療前後でのそれぞれの細菌構成の変動パターンを比較し、それらの類似度を解析する。本研究により唾液の細菌構成の由来が明らかになれば、従来の口腔ケアに足りなかったものが見えてくると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 研究対象

歯科医院受診者で歯周炎の認められた初診患者14名(56±10歳、男性9名、女性5名)。

(2) 口腔診査ならびに検体採取

歯周ポケット診査は6点法で測定した。検体採取については、唾液はガム咀嚼時の刺激唾液、舌苔はディスポーザルスプーンを用いて舌背全表面より採取、縁上、縁下プラークは1/4ブロック(上顎片側)よりスクレーパーを用いて採取した。

(3) 次世代シーケンサーによる細菌叢解析

ビーズ破砕法を用いて舌苔および唾液から抽出した細菌DNAをテンプレートとして16S rRNA 遺伝子のV1-V2領域をPCRで増

幅し、増幅したアンプリコンの塩基配列を1サンプルあたり、平均10,000シーケンス数を目処に半導体シーケンサーを用いてシーケンスを行った。これの配列について97%の相同性に基づき類似の配列を群分けすることで、生物学的には種レベルと同等の分類となる Operation Taxonomic Unit (OTU)を構築し、各OTUの代表配列を Human Oral Microbiome Database (HOMD)のデータベース中のデータと最も近似する細菌種に割り振ることでそれぞれのOTUが該当する細菌種を推定して、各マイクロバイオームの細菌構成を解析する。

4. 研究成果

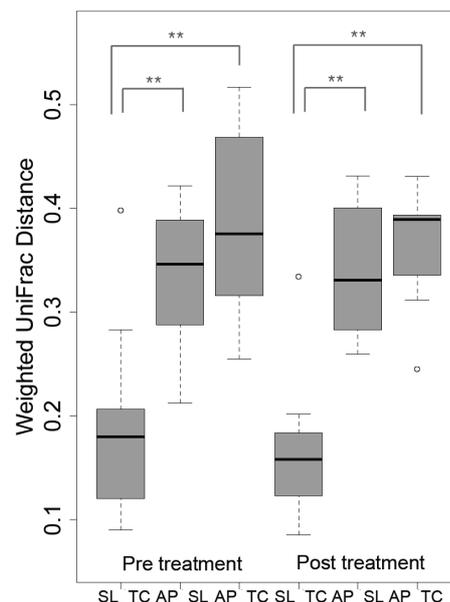
(1) 歯周治療前後における被験者の歯周組織状態の変化を表1に示す。歯周治療とメンテナンスにより、どの被験者も歯周組織状態の改善が認められた。

表1 歯周組織状態の変化

被験者番号	年齢	性別	歯周ポケット比率 (%)				期間(月)
			≧4 mm 治療前	治療後	≧7 mm 治療前	治療後	
1	46	男	77.7	23.5	29.6	3.1	28
2	58	男	22.0	8.3	0.8	1.5	29
3	73	男	41.3	13.7	1.4	1.4	27
4	64	男	35.7	23.6	1.8	0	27
5	58	男	69.1	33.3	16.7	1.8	29
6	51	女	72.7	8.4	12.7	1.3	27
7	57	女	41.3	3.1	0.6	0	27
8	35	男	28.1	17.6	1.8	0	25
9	72	男	31.5	16.0	0	0	26
10	48	女	39.4	15.5	6.1	1.1	23
11	59	男	21.4	9.6	7.1	5.6	23
12	63	男	85.8	60.9	33.3	11.7	23
13	43	女	49.3	16.7	13.3	2.8	22
14	59	女	38.2	21.8	11.7	5.8	20

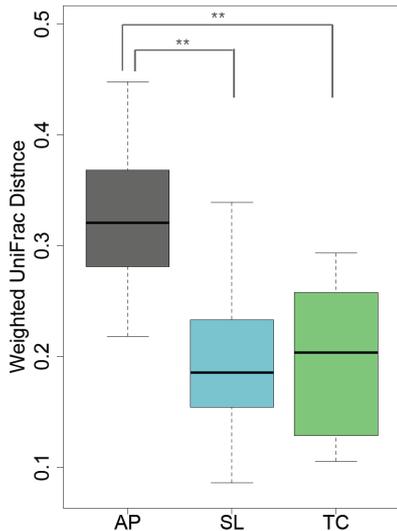
(2) 類似度指標 UniFrac を用いて細菌群集全体像について検討したところ、歯周治療前後とも、唾液(SL)と舌苔(TC)の細菌構成の類似度は唾液と縁上プラーク(AP)の細菌構成の類似度ならびに縁上プラークと舌苔の細菌構成の類似度に比べて有意に高かった(図1)。

図1 検体間の類似度の比較



さらに、歯周治療前後において、縁上プラークの細菌構成が大きく変化したのに対し、唾液も舌苔もともに細菌構成の変化量が有意に小さかった(図2)。

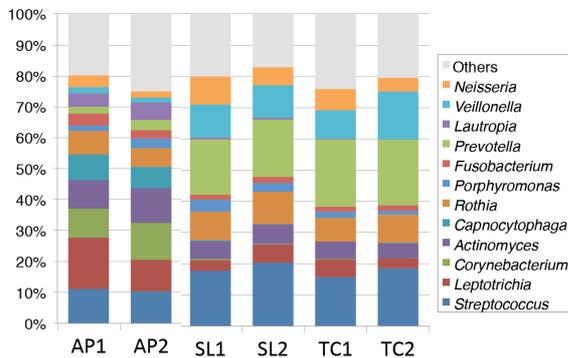
図2 各検体の歯周治療前後の変動量の比較



(3) 菌属レベルで各検体を比較したところ、唾液、舌苔ではともに *Streptococcus*、*Prevotella*、*Veillonella* が優勢でその細菌構成は類似していた。一方、縁上プラークでは、*Streptococcus* は唾液や舌苔と同様に優勢であったが、*Prevotella*、*Veillonella* は非常に少なく、*Leptotrichia*、*Actinomyces*、*Corynebacterium* が優勢であった。(図3)

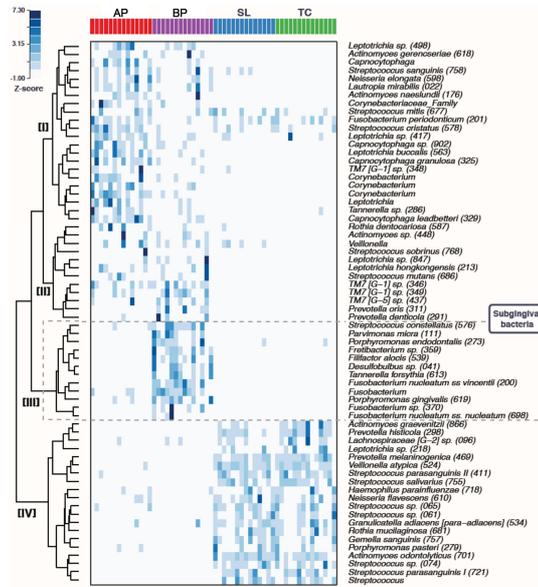
Streptococcus の菌種レベルでは、唾液と舌苔ともに、*Streptococcus salivarius*、*Streptococcus parasanguinis*、*Streptococcus mitis* が優勢で、縁上プラークでは *S. mitis* が優勢であった。菌属・菌種レベルにおいても唾液と舌苔は同様の細菌構成を示し、主要な菌種の治療前後における変化も類似していた。以上の結果から、唾液の細菌群集が舌苔由来である可能性が示唆された。

図3 各検体の細菌構成(菌属)



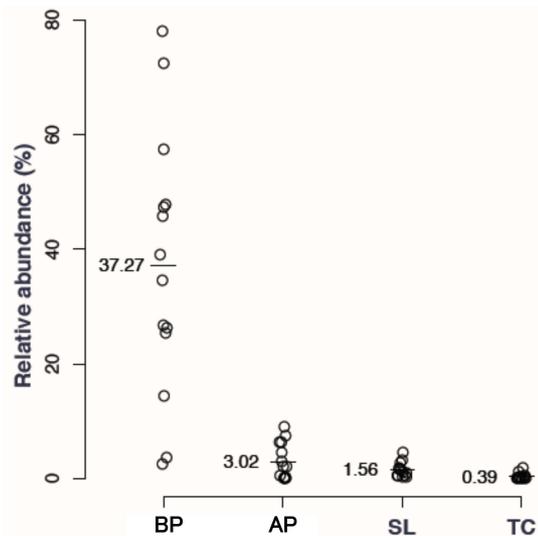
(4) 縁下プラーク(BP)に特徴的な細菌種を同定し(図4)それらと唾液細菌叢との関連、あるいは歯周病の重症度との関連について検討した。

図4 各検体に優勢な菌種分布



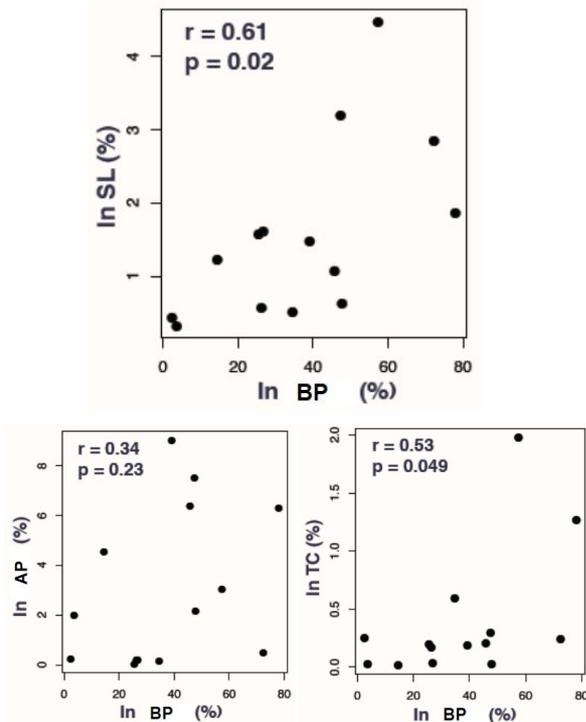
縁下プラークに特徴的に高い構成比率で存在する細菌種は12種類であり、これらの細菌を縁下プラークに特徴的な「縁下細菌群」と定義した。各検体について縁下細菌群の構成割合を調べたところ(図5)細菌構成の大きく異なる唾液や舌苔にもマイナー成分として一部含まれていることがわかった。

図5 各検体における縁下細菌群の構成比率



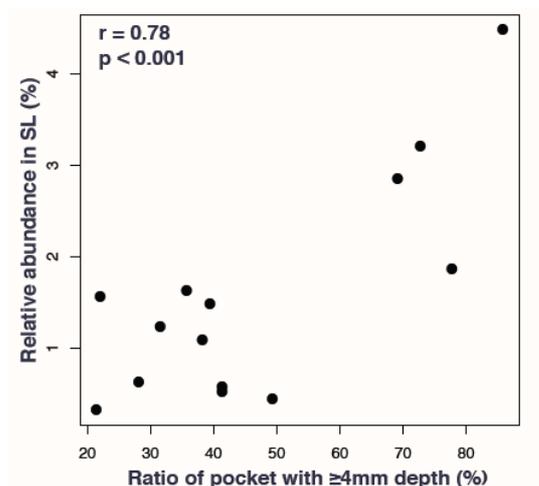
(5) 各検体に含まれる縁下細菌群の構成比率の関係について調べた結果を図6に示す。唾液と縁下プラーク間において縁下細菌群の構成比率は有意に相関しており、縁下プラーク中で縁下細菌群の構成比率が高くなるほど、唾液中においてもその構成比率は高くなっていった。

図6 縁下プラークに含まれる縁下細菌群の構成比率と各検体に含まれる縁下細菌群の構成比率との関係



(6) 唾液における縁下細菌群の構成比率と歯周状態の関係について調べた結果を図7に示す。4 mm以上のポケットの割合、つまり歯周病の重症度が上昇するにつれて、唾液中の縁下細菌群の構成比率も高くなり、唾液に含まれる縁下細菌群は歯周病の重症度を反映することが示唆された。

図7 唾液における縁下細菌群の構成比率と歯周状態の関係



文献 1

Takeshita T, Tomioka M, Shimazaki Y, Matsuyama M, Koyano K, Matsuda K, Yamashita Y. 2010. Microfloral characterization

of the tongue coating and associated risk for pneumonia-related health problems in institutionalized older adults. *J Am Geriatr Soc*, 58(6):1050-7.

文献 2

Takeshita T, Nakano Y, Kumagai T, Yasui M, Kamio N, Shibata Y, Shiota S, and Yamashita Y. 2009. The ecological proportion of indigenous bacterial populations in saliva is correlated with oral health status. *ISME J*. 3:65-78.

文献 3

Yamanaka W, Takeshita T, Shibata Y, Matsuo K, Eshima N, Yokoyama T, Yamashita Y. 2012. Compositional Stability of a Salivary Bacterial Population against Supragingival Microbiota Shift following Periodontal Therapy. *PLoS One*. 7:e42806.

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)

Kageyama S, Takeshita T, Asakawa M, Shibata Y, Takeuchi K, Yamanaka 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*. 12(4): e0174782. doi: 10.1371/journal.pone.0174782.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

山中 渉 (YAMANAKA, Wataru)
九州大学・大学院歯学研究院・共同研究員
研究者番号： 20726228

(2)研究分担者

柴田 幸江 (SHIBATA, Yukie)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号： 30274476

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

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()