

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：32710
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K12030
研究課題名(和文) 口腔内正常菌叢解明のための基礎的検討

研究課題名(英文) Analysis of healthy oral microbiome

研究代表者

野村 義明 (Nomura, Yoshiaki)

鶴見大学・歯学部・学内教授

研究者番号：90350587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、健康高齢者を対象として、唾液サンプルを採取し、口腔のコアマイクロバイオームの解明を試みた。次世代シーケンサーによる解析では85名の対象者から、1,953,706 readsが得られ、Speciesのレベルで1,195菌種が検出された。90%以上の対象者に検出された菌種は37菌種で細菌叢全体の82.6%を占めていた。37菌種の中には、全身の健康状態に悪影響を及ぼす可能性のある菌種が含まれていた。従来、口腔のコアマイクロバイオームは各菌種の検出率で議論されることが多かったが、今後は各細菌の性質、相互作用、バランスを考慮し健全な細菌叢の概念を形成してゆく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代シーケンサーの普及により、ヒトの細菌叢の網羅的な解析が大きく進歩した。特に口腔の細菌叢は、抗菌性物質を含む洗口剤等が使用可能なため、細菌叢のコントロールが比較的容易である。近年では、口腔の2大疾患である、う蝕、歯周病においても従来う蝕病原性菌、歯周病菌とされていた菌の保菌以上に細菌叢の乱れが疾患の発症に関与していることが示唆されている。さらに、口腔細菌叢が全身の健康状態に大きく関連していることも示唆されている。しかし、本来持つべき健全な口腔細菌叢の解明は充分ではない。以上の点から、健全な口腔細菌叢の解明は今後の口腔疾患をはじめとする様々な疾患の解明、予防に大きく貢献できるものである。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that oral microbiome effect on the healthy status of human body. In this study, we analyzed the salivary microbiome of the eighty five healthy older person at the age of 90. By the next generation sequence, 1,953,706 reads were obtained and 1,195 bacteria were detected at species level. The species detected from more than 90 percent subjects 37 and they occupied 82.6% of total detected species. These bacteria can be the candidate of core oral microbiome. However, several pathogenic bacteria were included. Human core microbiome should be considered not merely prevalence and abundance. Interaction and balance of bacteria should be considered to define the healthy oral microbiome.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：microbiome oral teeth older person

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの口腔内には約 700 種類の細菌が生息しているとされてきた。これらの細菌は、ヒトの口腔内マイクロバイオームを構成している。ヒトのマイクロバイオームは、次世代シーケンサーとバイオインフォマティクスの発展により研究成果が蓄積されてきた。ヒトの口腔内マイクロバイオームと特定の全身性疾患との間に関係があることが示され、膵臓癌、2 型糖尿病、小児クローン病、心臓病、低体重出産、早産との関連も示唆されている。また、口腔の二大疾患であるう蝕と歯周病は、う蝕原性菌、歯周病菌の保菌やその量以外にもマイクロバイオームの乱れによる影響も示唆されるようになった。その一方で、健全な疾患予防に繋がる口腔細菌叢とはなにかという疑問に答えるために健康者が保有する細菌叢を検討することを目的とした。

2. 研究の目的

健康な高齢者の微生物叢を調査することは、健康な微生物叢を調査するのに適していると考え、90 歳の健康な高齢者の口腔マイクロバイオームを分析した。口腔コアマイクロバイオームにふさわしい菌種を検討した。

3. 研究の方法

厚生労働研究、科学研究費によって継続してきた新潟コホート研究に参加し、サンプル採取を行った。85 名の 90 歳の健康な高齢者から刺激唾液サンプルを採取した。5 分間のパラフィンワックス咀嚼による刺激唾液を採取した。DNA は、Promega Maxwell 16 によって抽出し、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 超可変領域を PCR によって増幅した。シーケンスは、MiSeq を使用して行った。EzTaxon-e データベースからの 97% の ID 検索に基づいて菌種を特定した。

4. 研究成果

対象者の年齢は 90 歳で男性 40 名、女性 45 名の計 85 名からサンプルを採取した。シーケンスの結果は、1,953,706reads で Species のレベルで 1,195 菌種が検出された。全体像を把握するために、Species のレベルでのすべての Reads によるヒートマップを図 1 に示す。いくつかの Species では、すべてのまたはほとんどのサンプルで共通して、またその量も多く検出されたことがわかる。一方で、大部分の菌は一部のサンプルで、しかも少量が検出されていた。

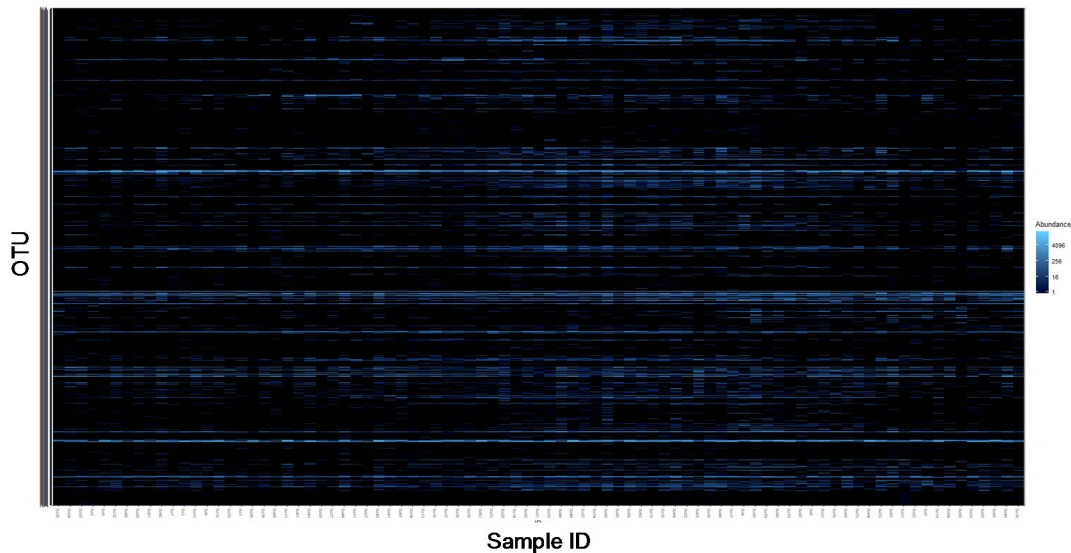


図 1 Species 全体のヒートマップ

図 2 は、Phylum のレベルでの平均相対存在量と菌種の分類群有病率による散布図を示している。Phylum のレベルでは Acidobacteria, Bacteroides, Firmicutes の検出が高く続いて Fusobacteria, Proteobacteria, TM7 の検出が高かった。

Species のレベルで 85 名の全ての対象者から以下の 13 菌種が検出された。13 菌種は *Streptococcus sinensis* group, *Streptococcus pneumoniae* group, *Streptococcus salivarius* group, KV831974_s group, *Streptococcus parasanguinis* group, *Veillonella dispar*, *Granulicatella adiacens* group, *Streptococcus_uc*, *Streptococcus peroris* group, KE952139_s, *Veillonella parvula* group, *Atopobium parvulum*, AFQU_s でこれらの菌種の構成割合は全体の 59.8% を占めていた。

これらの菌種のうち、*Streptococcus sinensis* group は細菌性心内膜炎の病原菌である。*Streptococcus pneumoniae* はヒトの呼吸器疾患に対する主要な病原菌である。*Atopobium parvulum* は粘膜内癌患者から検出され、近年注目されるようになってきた菌種である [1]。また、Species のレベルで 95% 以上の対象者から検出された菌種は、*Veillonella atypica*,

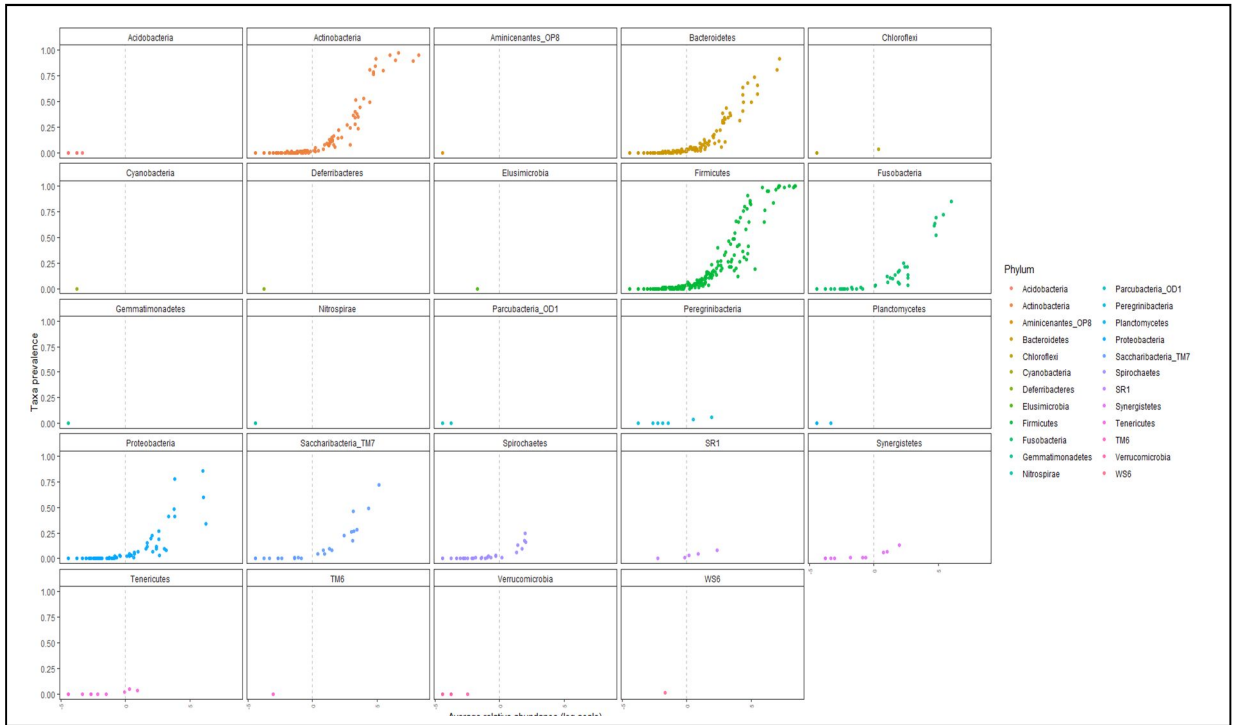


図2 検出率と検出量のプロット

Actinomyces_uc, *Rothia_uc*, *Veillonella_uc*, *Rothia mucilaginosa* group, *Streptococcus gordonii* group, *Gemella haemolysans* group, *Campylobacter concisus* group, *Prevotella melaninogenica*, *Rothia dentocariosa*, *Stomatobaculum longum*, *JVLH_s*, *Actinomyces odontolyticus*, *Solobacterium moorei* の14菌種であった。これらの菌種の構成割合は全体の16.8%を占めていた。

Campylobacter concisus はクローン病や潰瘍性大腸炎を含む腸疾患患者の腸内から検出される菌種である[1]。*Actinomyces odontolyticus* は前述の *Atopobium parvulum* と同様に粘膜内癌患者から検出された菌種である[1]。

対象者の90-95%から検出された菌種は *Fusobacterium nucleatum* group, *Megasphaera micronuciformis*, *Lachnoanaerobaculum saburreum* group, *Prevotella histicola*, *Haemophilus parainfluenzae* group, *Prevotella_uc*, *Streptococcus sanguinis* group, *Actinomyces graevenitzii*, *Prevotella salivae*, *Oribacterium asaccharolyticum* の10菌種であった。これらの菌種の構成割合は全体の7.1%を占めていた。

Fusobacterium nucleatum group は歯周病患者で多く検出される他、口臭の原因菌であることも示唆されている。さらに *Fusobacterium nucleatum* group は大腸癌との関連も示唆されている[2]。

以上のSpeciesのレベルで37菌種が口腔細菌全体の82.6%を占めていることから、これら37菌種は口腔のコアマイクロバイームを形成していることが示唆される。しかし、これらの菌の中には、口腔の病原菌や全身の健康に悪影響を及ぼす可能性のある菌種が複数含まれている。この点から口腔内の細菌はいわゆる善玉菌と悪玉菌が一定のバランスを保ち、様々な疾患発症のリスクを常に持ちながら、バランスによって疾患の発症を抑制していることが示唆される。

従来、口腔のコアマイクロバイームは各菌種の検出率のみで議論されることが多かったが全身の健康への悪影響を及ぼす可能性のある菌種をコアマイクロバイームとすることは今後議論の余地があるところであると思われる。今後、各菌種の性質をより詳細に解明してゆくとともにこれらの菌種の相互作用についても検討してゆく必要がある。また、口腔のマイクロバイームには、人種、生活環境の影響をうけることも示唆されている。さらに、今回の対象者が90歳という高齢者であるため、年齢の影響を受けている可能性も否定できない。人種差、環境、年齢に応じた健康なコアマイクロバイームの概念を形成してゆくことも必要かもしれない。

<引用文献>

1. Yachida S, Mizutani S, Shiroma H et al. Metagenomic and metabolomic analyses reveal distinct stage-specific phenotypes of the gut microbiota in colorectal cancer. Nat Med. 2019 Jun;25(6):968-976.
2. Bronzato JD, Bomfim RA, Edwards DH et al. Detection of *Fusobacterium* in oral and head and neck cancer samples: A systematic review and meta-analysis Arch Oral Biol. 2020 Apr;112:104669.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nomura Y, Takei N, Ishii T, Takada K, Amitani Y, Koganezawa H, Fukuhara S, Asai K, yuji Uozumi R, Bessho K.	4. 巻 Dec 10
2. 論文標題 Factors That Affect Oral Care Outcomes for Institutionalized Elderly	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Dent	6. 最初と最後の頁 2478408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/2478408	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 Nomura Y, Morozumi T, Nakagawa T, et al.	4. 巻 Dec 4;12(12)
2. 論文標題 Site-level progression of periodontal disease during a follow-up period.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0188670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0188670. eCollection 2017.	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 Okada A, Sogabe K, Takeuchi H, Okamoto M, Nomura Y, Hanada N.	4. 巻 Dec 27;59(4)
2. 論文標題 Characterization of specimens obtained by different sampling methods for evaluation of periodontal bacteria.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Oral Sci.	6. 最初と最後の頁 491-498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.16-0573. Epub 2017 Nov 17.	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 Arai C, Nomura Y, Matsuzawa M, Hanada N, Nakamura Y.	4. 巻 Nov;83
2. 論文標題 Extracellular HSP72 induces proinflammatory cytokines in human periodontal ligament fibroblast cells through the TLR4/NF- κ B pathway in vitro.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arch Oral Biol.	6. 最初と最後の頁 181-186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2017.07.021. Epub 2017 Jul 30.	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 Nomura Y, Takeuchi H, Okamoto M, Sogabe K, Okada A, Hanada N.	4. 巻 Jun;18
2. 論文標題 Chair-side detection of Prevotella Intermedia in mature dental plaque by its fluorescence.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Photodiagnosis Photodyn Ther.	6. 最初と最後の頁 335-341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pdpdt.2017.04.010. Epub 2017 Apr 27.	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 Nomura Y, Okada A, Kakuta E, Otsuka R, Sogabe K, Yamane K, Yamamoto T, Shigeta Y, Shigemoto S, Ogawa T, Hanada N.	4. 巻 19(1)
2. 論文標題 Consistency of supplied food and dentition status of the elderly in residential care homes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	6. 最初と最後の頁 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12903-019-0770-0.	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 Nomura Y, Maung K, Kay Khine EM, Sint KM, Lin MP, Win Myint MK, Aung T, Sogabe K, Otsuka R, Okada A, Kakuta E, Wint WY, Uruguchi M, Hasegawa R, Hanada N.	4. 巻 2019
2. 論文標題 Prevalence of Dental Caries in 5- and 6-Year-Old Myanmar Children.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Dent	6. 最初と最後の頁 6986412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/6986412.	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 Inai Y, Nomura Y, Takarada T, Hanada N, Wada N.	4. 巻 Feb 7.
2. 論文標題 Risk factors for postoperative pneumonia according to examination findings before surgery under general anesthesia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Oral Investig	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-020-03230-7.	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 Nomura Y, Tsutsumi I, Nagasaki M, Tsuda H, Koga F, Kashima N, Uraguchi M, Okada A, Kakuta E, Hanada N.	4. 巻 Feb 8
2. 論文標題 Supplied Food Consistency and Oral Functions of Institutionalized Elderly.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Dent.	6. 最初と最後の頁 2020:3463056.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/3463056.	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 Terai T, Kato K, Ishikawa E, Nakao M, Ito M, Miyazaki K, Kushiro A, Imai S, Nomura Y, Hanada N, Okumura T.	4. 巻 Mar 21
2. 論文標題 Safety assessment of the candidate oral probiotic <i>Lactobacillus crispatus</i> YIT 12319: Analysis of antibiotic resistance and virulence-associated genes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food Chem Toxicol.	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fct.2020.111278.	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hanada Nobuhiro, Nomura Yoshiaki, Okamoto Masaaki, Daikoku Hideki, Sato Tamotsu
2. 発表標題 The Analysis of Oral Microbiome of Centenarian in Japan
3. 学会等名 IADR/AADR/CADR General Session (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hanada Nobuhiro, Okamoto Masaaki, Miyahara Mayu, Nomura Yoshiaki, Imai Susumu, Saito Wataru, Momoi Yasuko, Miyabenishiwaki Takako, Tomonaga Masaki
2. 発表標題 The Analysis of Oral Core Microbiome of Chimpanzees (<i>Pan troglodytes</i>)
3. 学会等名 IADR/PER General Session (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大塚 良子, 今井 奨, 阿部 繭, 岡田 彩子, 有吉 芽生, 菊地 朋宏, 村田 貴俊, マティン・カイルール, 野村 義明, 花田 信弘, 桃井 保子, 熊谷 崇
2. 発表標題 がん治療周術期における口腔内環境の変化 1症例報告
3. 学会等名 日本口腔衛生学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田 秀則, 岡田 彩子, 宮之原 真由, 曾我部 薫, 村田 貴俊, 武内 博朗, 野村 義明, 花田 信弘
2. 発表標題 全身的な健康を歯科から考える"予防医学"としての概念を歯科へ 『3DS除菌外来』の試み(第四報)
3. 学会等名 日本口腔衛生学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 曾我部 薫, 野村 義明, 村田 貴俊, 花田 信弘
2. 発表標題 現在歯数に着目した高齢者施設での食と栄養指導システムの構築
3. 学会等名 日本口腔衛生学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 角田 衣理加, 大島 朋子, 野村 義明, 花田 信弘, 前田 伸子
2. 発表標題 高齢者の認知機能と口腔微生物の相関
3. 学会等名 日本口腔衛生学会
4. 発表年 2017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	岡本 公彰 (Masaaki Okamoto) (30116008)	鶴見大学・歯学部・非常勤講師 (32710)	
研究 分担者	武内 博朗 (Hiroaki Takeuchi) (50572260)	鶴見大学・歯学部・臨床教授 (32710)	
研究 分担者	花田 信弘 (Nobuhiro Hanada) (70180916)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	