

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592350

研究課題名（和文） 人類進化モデルにおけるプロバイオテックスの効果

研究課題名（英文） Effects of probiotics in human evolutionary model

研究代表者

岡本 公彰（OKAMOTO MASAOKI）

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：30116008

研究成果の概要（和文）：チンパンジーの口腔細菌叢をピロシーケンシング法で網羅的に解析すると、ヒトとは異なりベイヨネラ科が大部分を占めた。う蝕原因菌と考えられるストレプトコッカスについては、モンキーおよびヒトとは異なる固有の細菌を発見し、*Streptococcus troglodytae* と命名した。口腔細菌は宿主の進化と同時に進化していることが分かり、チンパンジー口腔の研究がヒト口腔疾患の改善をもたらすのではないかと考えられた。

研究成果の概要（英文）：We have been analyzing the oral flora in chimpanzee by the pyrosequencing method, and found the major family was *Veillonellaceae*, which was different from human oral flora. We have also found a novel mutans streptococci in chimpanzee oral cavities, and named as “*Streptococcus troglodytae*”, which was different kind of indigenous streptococci isolated from human and monkey. These results suggest that the investigation of chimpanzee oral cavities may contribute human oral health, because the oral flora has been evolved with the host evolution.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：人類進化モデル、歯学、微生物、社会医学、進化

1. 研究開始当初の背景

チンパンジーは遺伝学的に最もヒトに近縁の動物で、人類進化モデルとしてチンパンジーとヒトの口腔を比較することにより、ヒト口腔衛生への有用な情報を得ることが出来るものと考えられる。例えば、チンパンジーはヒトと異なり歯を磨く習慣はない。また口腔状態と疾患との関連を推測するには、ヒトでは個々のファクターが存在し、複雑であ

る。我々は、京都大学霊長類研究所との共同研究でチンパンジーの口腔ケアを担当する機会が与えられた。

口腔疾患は細菌による感染症と考えられ、チンパンジーの口腔細菌叢を調べる必要がある。口腔細菌叢は培養法では300～700種程度報告されているが、近年開発された16S rRNA 遺伝子をピロシーケンシング法で解析する方法では、一万種を超えることが報告さ

れ、培養されない細菌が口腔に多く存在することが分かった。

有害な口腔細菌を除去するための抗生物質投与などは耐性菌の出現をもたらす、広く動物およびヒトに影響を及ぼすことが考えられる。このことを解決する一つの方法として細菌間の相互作用を利用し、有害な口腔細菌の生育を抑制するプロバイオテックスを適用することにより口腔疾患の予防が可能ではないかと考えられた。

2. 研究の目的

(1) 培養法とピロシーケンシング法を用いてチンパンジーの口腔細菌叢を調べる。

(2) チンパンジーの口腔状態を調べる。

(3) 有害な口腔細菌の生育を細菌相互作用により抑制し、チンパンジーの口腔疾患の予防を試み、ヒト口腔衛生の改善に役立てることである。

3. 研究の方法

京都大学霊長類研究所で飼育しているチンパンジーについて口腔細菌叢と口腔状態を観察する。

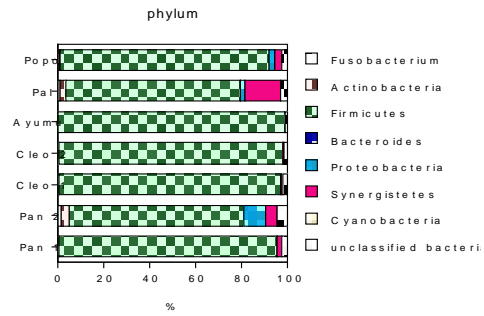
(1) ピロシーケンシング法による細菌叢の解析；チンパンジーのデンタルプラークを採取し、DNAを抽出して16S rRNA遺伝子をPCR法で増幅し、遺伝子配列を解析する。これらのデータをDNA Data Bank of Japan (DDBJ)、National Center for Biotechnology Information (NCBI)、Human Oral Microbiome Database (HOMD)、Ribosomal Database Project (RDP)およびEzTaxon-e Databaseなどのクラウドプログラムを用いて解析する。

(2) 従来行われてきた培養法による解析；デンタルプラークをMS培地あるいは変法MS培地などの選択培地で培養し、分離された菌株について生化学的性状などを調べる。

(3) 口腔状態の観察；全身麻酔下でチンパンジーの口腔診査を行う。

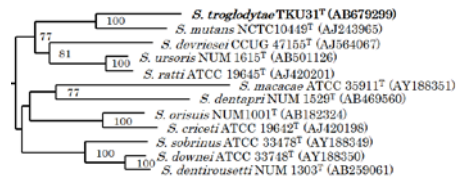
4. 研究成果

(1) ピロシーケンシング法により得られた口腔細菌叢の結果；3% cutoff値で280 OTUs (operational taxonomic unit)に分けることが出来、培養されない菌種が多く含まれていた。分類の結果、phylumではFirmicutes (86.3%)が最も多く、そのなかでVeillonella科が多く存在した。次いでphylumではTM7 (7.2%)、Synergistes (1.8%)の順であった。図はチンパンジー各個体のphylumを示す。



(2) う蝕と最も関連するミュータンスレンサ球菌群の培養法により得られた結果；

① *S. mutans* に最も近縁の新菌種が見出され、*Streptococcus troglodytae* と命名した。図は16S rRNA遺伝子による本菌を含むミュータンスレンサ球菌群の系統樹である。



ヒトにう蝕を起こすミュータンスレンサ球菌は、人類の農耕文明が起きた約1万年前に変異を起こし出現したとされている (Cornejo OE *et al.*, Mol Biol Evol, 2013)。

我々が新菌種を提唱し、その遺伝子情報を基に、Argimon らはこの菌種をコンゴで成育しているチンパンジー口腔から数株分離し、この菌と、ミュータンスレンサ球菌群のなかでコウモリから分離され、最も進化が古いと思われる *S. dentirosetii*、および *S. mutans* を選び、これら細菌のグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子を解析した。その結果、う蝕の起源は農耕文明と関係なく存在したのではないかと提唱している (Argimon S *et al.*, Pros One 2013)。

② ストレプトコッカスの菌種構成を培養法で調べた結果、我々が新菌種を提案した *S. troglodytae* が4個体から(36%)および *S. dentirosetti* が3個体から(27%)分離された。ヒトから分離される *S. mutans* が1個体から(9%)分離されたが、*S. sobrinus*、およびチンパンジー程進化が進んでいないモンキーから分離される *S. downei*、*S. macacae* は全く分離されなかった。このことから、チンパンジー口腔にはヒトあるいはモンキーとは異なる固有の細菌が存在し、宿主の進化と同時に口腔細菌も進化することが明確となった。

(3) 細菌学的検索と同時に行われた、う蝕、歯周病などの口腔内診査の結果は極めて良好であった (Momoi *et al.*)。

現在、*S. troglodytae* の whole genome sequencing による病原因子の遺伝子検索を行っているが、*S. mutans* と極めて類似し、う蝕病原性も類似しているのではないかと考えている。このことから、チンパンジー口腔細菌叢には有害な細菌の生育あるいは病原因子を抑制するプロバイオテックス作用を持つ細菌が既に存在している可能性が考えられ、新たなプロバイオテックスは必要がないものと考えられた。

チンパンジー細菌叢の多くを占める *Veillonella* 科の口腔環境への関与などについて、プロバイオテックス作用の中心となる乳酸産生等との関連を含め引き続き検討中である。

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2件)

- ① Miyanohara M, Imai S, Okamoto M, Saito W, Nomura Y, Momoi Y, Tomonaga M, Hanada N. Distribution of *Streptococcus troglodytae* and *Streptococcus dentirousetti* in chimpanzee oral cavities. *Microbiol Immunol*. 2013 Mar 28. [Epub ahead of print] (査読有)
doi: 10.1111/1348-0421.12047.
- ② Okamoto M, Imai S, Miyanohara M, Saito W, Momoi Y, Abo T, Nomura Y, Ikawa T, Ogawa T, Miyabe-Nishiwaki T, Kaneko A, Watanabe A, Watanabe S, Hayashi M, Tomonaga M, Hanada N. *Streptococcus troglodytae* sp. nov., from the chimpanzee oral cavity. *Int. J Syst Evol Microbiol*. 2013 Feb; 63 (Pt 2): 418-22. (査読有)
doi: 10.1099/ijms.0.039388-0

[学会発表] (計10件)

- ① Okamoto M, Imai S, Miyanohara M, Saito W, Momoi Y, Abo T, Nomura Y, Ikawa T, Ogawa T, Miyabe-Nishiwaki T, Kaneko A, Watanabe A, Watanabe S, Hayashi M, Tomonaga M and Hanada N. A Novel Mutans Streptococci isolated from Chimpanzee Oral Cavity The sixth International Association for Dental Research Pan-European Region Meeting (IADR/PER). 2012, 9, 12-15, Helsinki, Finland.
- ② Imai S, Okamoto M, Miyanohara M, Saito

W, Momoi Y, Abo T, Nomura Y, Ikawa T, Ogawa T, Miyabe-Nishiwaki T, Kaneko A, Watanabe A, Watanabe S, Hayashi M, Tomonaga M and Hanada N. Distribution of Streptococci in Oral Flora of Chimpanzee The sixth International Association for Dental Research Pan-European Region Meeting (IADR/PER). 2012, 9, 12-15, Helsinki, Finland.

- ③ 岡本公彰, 今井 奨, 花田信弘 「チンパンジー口腔内から分離された *Streptococcus mutans* 様菌株について」、第85回日本細菌学会総会、2012, 3, 27-29、長崎ブリックホール
- ④ 宮之原真由, 今井奨, 齋藤渉, 山口貴央, 阿保備子, 野村義明, 桃井保子, 花田信弘 「チンパンジー口腔由来のレンサ球菌の性状に関する研究」、第60回日本口腔衛生学会、2011. 10. 8-10、日本大学松戸歯学部
- ⑤ Okamoto M, Miyanohara M, Abo T, Saito W, Ogawa T, Momoi Y, Sakamoto M., Ohkuma M, Miyabe-Nishiwaki T and Hanada N. Preliminary Analysis of Oral Flora isolated from Chimpanzee XIII, International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (国際細菌学会). 2011, 9, 6-10(札幌).
- ⑥ Okamoto M, Miyanohara M, Abo T, Imai S, Nomura Y, Saito W, Ogawa T, Momoi Y, Sakamoto M, Ohkuma M, Watanabe S, Maeda N, Watanabe A, Kaneko A, Miyabe-Nishiwaki T, Tomonaga M and Hanada N. Pyrosequencing Analysis of Oral Flora isolated from Chimpanzees. The 45th Meeting of the Continental European Division of the International Association for Dental Research the (CED-IADR), 2011, 8/31 -9/3, Budapest, Hungary.
- ⑦ 阿保備子, 宮之原真由, 今井奨, 岡本公彰, 齋藤渉, 山口貴央, 井川知子, 小川匠, 野村義明, 宮部貴子, 桃井保子, 花田信弘 「チンパンジー口腔由来のミュータンスレンサ球菌様細菌に関する研究」、鶴見大学歯学会第73回例会、2011. 6. 25、鶴見大学会館メインホール
- ⑧ 宮之原真由, 今井奨, 齋藤渉, 山口貴央, 小川匠, 井川知子, 岡本公彰, 阿保備子, 野村義明, 西村剛, 宮部貴子, 藤澤道子, 友永雅己, 桃井保子, 花田信弘 「チンパンジー歯垢より単離したレンサ球菌の性状に関する研究」、鶴見大学歯学会第72回例会、2010. 12. 18、鶴見大学会館メインホール

- ⑨ 小川匠, 井川知子, 齋藤渉, 今井奨, 野村義明, 岡本公彰, 桃井保子, 花田信弘, 兼子明久, 渡辺朗野, 渡辺祥平, 宮部貴子, 友永雅己 「チンパンジーの口腔内および顎顔面領域の定期健診ならびに歯科処置について」、鶴見大学歯学会第 72 回例会、2010. 12. 18、鶴見大学会館メインホール
- ⑩ Momoi Y, Saito W, Ogawa T, Ikawa T, Nomura Y, Imai S, Hanada N, Miyabe T, Watanabe A, Kanaeko A, Watanabe S, and Tomonaga T. Oral Status of Chimpanzees in Primate Research Institute Kyoto University. 58th Annual Meeting of the JADR (国際歯科研究学会日本部会), Kitakyusyu, Japan. 2010, 11, 20-21. Kyusyu Dental College.

[その他]

ホームページ等

<http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/pub/ronbun/0353.html>

<http://langint.pri.kyoto-u.ac.jp/ai/ja/publication/tomonaga/Miyanohara2013.htm>
1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 公彰 (OKAMOTO MASA AKI)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：30116008

(2) 研究分担者

花田 信弘 (HANADA NOBUHIRO)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：70180916

野村 義明 (NOMURA YOSHI AKI)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：90350587