

**研究者：外山 直樹**（所属：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科予防歯科学分野）

**研究題目：次世代シーケンサーを用いた歯周炎抑制性細菌の探索**

#### 目的：

歯周炎は、細菌感染によって引き起こされる炎症性疾患で、口腔衛生習慣に起因する生活習慣病としても位置付けられている。歯周炎は歯を失う二大疾患のひとつであり、歯の喪失による生活の質の低下を引き起こす（Peterson et al., 2003）。さらに、糖尿病・腎疾患・早産・誤嚥性肺炎・動脈硬化など全身に悪影響を及ぼす（歯周治療の指針、2015）。平成 28 年の歯科疾患実態調査では、前回調査時よりもすべての年代で歯周病の有病率が増加していた。以上より、歯周病を予防することは非常に重要である。

一方、子供の腸内細菌叢の形成に母親の歯周病が関与することが示唆されている（Xiao et al., 2020）。腸内細菌叢は、免疫応答や骨代謝にも影響を与える重要な側面を持つことから、近年多くの研究者から注目されており、次世代シーケンサーを用いた網羅的細菌叢解析がなされている。

近年、次世代シーケンサーを用いた歯周炎患者の口腔内細菌叢解析も盛んに行われ、歯周炎の重症度と正の相関を示す菌種が報告されている。しかし、歯周炎と負の相関を示す菌種の報告はほとんどない。本研究の目的は、予防歯科に定期受診している患者を対象とした口腔内細菌叢の解析を行い、健全な歯周組織を持つ者に多くみられる菌種を明らかにすることであった。

#### 対象および方法：

##### 1. 対象者

調査対象者は岡山大学病院予防歯科受診者 50 名とした。対象者には口腔内診査、自己記入式質問票調査、唾液採取、体組成測定を行った。過去 6 か月以内に抗生物質を使用している者およびうがい薬を常用している者を除外した 34 名をマッチング対象者とした。

##### 2. 口腔内診査

口腔内診査では、現在歯すべての歯周ポケット深さ（Probing pocket depth：PPD）、臨床的アタッチメントレベル（Clinical attachment level：CAL）、動揺度を測定した。パノラマエックス線撮影法を用いて、エックス線写真上の骨欠損レベル（Radiographic bone level：RBL）を調査した。日本歯周病学会の診断基準に基づき、ステージ 1 もしくは 2 の者を健常群、ステージ 3 もしくは 4 の者を歯周炎群とした（日本歯周病学会、2019）。

##### 3. 自己記入式質問票調査

質問票を用いて歯周疾患のリスクファクターである年齢、性別、ストレス、喫煙、糖尿病について調査した（歯周治療の指針、2015）。また、細菌叢に影響を及ぼす、飲酒状況、間食の有無、歯間ブラシやフロスの使用状況、最後の飲食および歯磨きからの時間（Pilar et al., 2019）を調査した。

##### 4. 唾液分析

診療開始前に 3ml の滅菌水を用いて 10 秒間うがいしてもらい、吐き出してもらい、吐出法で

唾液を採取した (Jo et al., 2019)。

唾液サンプルを用いて、口腔内細菌叢のメタゲノム解析を行った。唾液サンプルから DNA を抽出し、「16SMetagenomics Sequencing Library Preparation」に基づいて 16SrDNA の V3-V4 領域を増幅した (1st Polymerase Chain Reaction, 1st PCR)。アダプターとインデックスの付与を行った後 (2nd PCR)、次世代シーケンシングを行った。UPARSE によるリードの処理後、得られたシーケンスリードを配列の 97% 相同性で Operational taxonomic unit (OTU) にクラスタリングし、それぞれの OTU に対応する菌種はデータベースを照合し決定した。

## 5. 体組成測定

手動身長計付き体組成計 (TANITA、東京) を用いて、身長、体重、体組成を測定した。

## 6. 統計解析

歯周病のリスク因子である年齢、性別、喫煙、ストレス、糖尿病、BMI (歯周治療の指針、2015) および、菌叢に影響を及ぼす間食回数、歯間ブラシとフロスの使用の有無、最後の飲食および口腔清掃からの経過時間 (Pilar et al., 2019) を共変量として、個々の対象者が歯周病群に割り付けられる確率 (傾向スコア) を算出した。キャリパー値は 0.2 に設定した。そして、歯周病群と健常群の傾向スコアに差がないようにマッチングを行った。マッチング後にカイ二乗検定もしくは対応のない t 検定を用いて、群間の共変量に差がないことを確認した。

唾液中の細菌叢について、 $\alpha$ 多様性 (各群内の菌種数と均等性) と  $\beta$ 多様性 (2 群間の多様性の相違度) を検討した。 $\alpha$ 多様性は Shannon 指数と Simpson 指数を用いて評価した。 $\beta$ 多様性は加重 (読み取った DNA 断片の数を考慮し細菌叢の構成を表す) および非加重 (読み取った DNA 断片の数を考慮せず細菌叢の構成メンバーを表す) UniFrac 距離を用いた主座標分析 (Principal Coordinate Analysis, PCoA) で評価した。群間の類似性を Adonis と Anosim の値によって、群分散の均一性を Permdisp2 の値で検討した。また、Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) を用いて、群間で異なる細菌種を探索した。有意水準は 5% に設定した。

## 結果および考察：

マッチング後、22 名を分析対象者とした (男性 11 名、 $73.3 \pm 7.3$  歳)。すべての共変量で群間に差がないことを確認した。

次世代シーケンサーにより、唾液中の口腔細菌 336 種を同定した。

図 1 に  $\alpha$ 多様性の結果を示す。Shannon 指数は存在量が少ない種に、Simpson 指数は豊富な種にそれぞれ重み付けがされている。したがって、健常者群は歯周炎群と比較して菌種が少なく、存在量が少ない細菌種数に差があることが示唆された。

図 2 に  $\beta$ 多様性の結果を示す。加重 UniFrac 距離においては差がなかった。非加重 UniFrac 距離においては、健常群と歯周炎群の類似性は異なっていた (Adonis,  $p=0.038$ ; Anosim,  $p=0.044$ ) が、群分散のばらつきがなかった (Permdisp2,  $p=0.559$ )。したがって、特定の菌種の有無により健常群と歯周炎群の類似性は低いことが示唆された。

図 3 に LEfSe の結果を示す。健常群で多く認められた菌種は *Streptococcus sanguinis*, *Veillonella rogosae*, *Prevotella nanceiensis* であった。*S. sanguinis* はう蝕の抑制性に働き、*Streptococcus mutans*/*Streptococcus sanguinis* 比が低いほど、カリエスリスクが低いことが報告されている

(Caufield et al., 2000)。また、Mashima らによると、*Veillonella rogosae* は *Streptococcus sanguinis* との相互作用により *Streptococcus sanguinis* 単独と比較してバイオフィーム形成量が低下することが報告されている (Mashima et al., 2014)。*Prevotella nanceiensis* は唾液中に多くみられる口腔常在菌であり (Maruyama et al., 2020)、CD4 陽性 T 細胞が 20% 以下であることと強く関連している (Coker et al., 2020)。一方、う蝕との関連も報告されており (Coker et al., 2020)、う蝕の状況を考慮したさらなる研究が必要である。

以上より、健全な歯周組織を持つ者に多く存在する菌種は、*Streptococcus sanguinis*, *Veillonella rogosae*, *Prevotella nanceiensis* であることが示唆された。

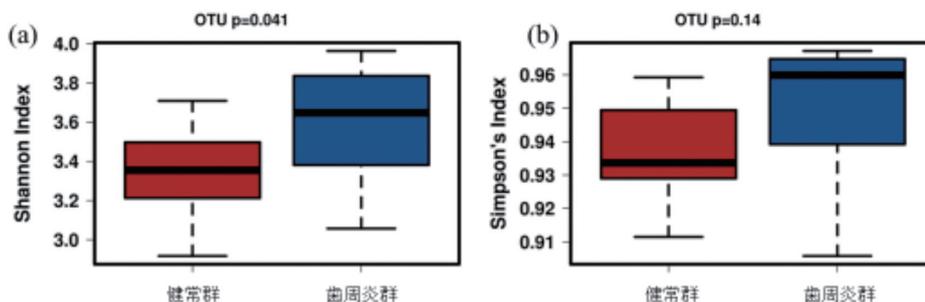


図1  $\alpha$ 多様性の結果；(a) Shannon 指数、(b) Simpson 指数  
OUT, operational taxonomic unit

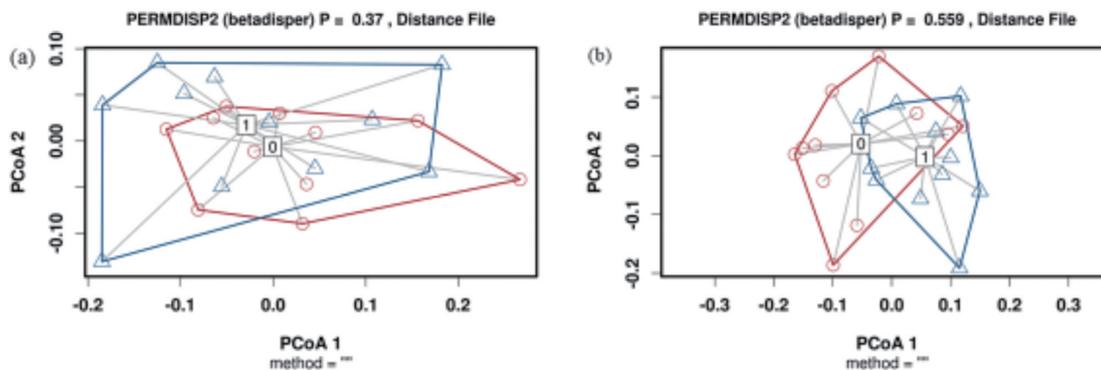


図2  $\beta$ 多様性の結果；(a) 加重 UniFrac 距離、(b) 非加重 UniFrac 距離  
0, 健常群；1, 歯周炎群；PCoA, Principal Coordinate Analysis

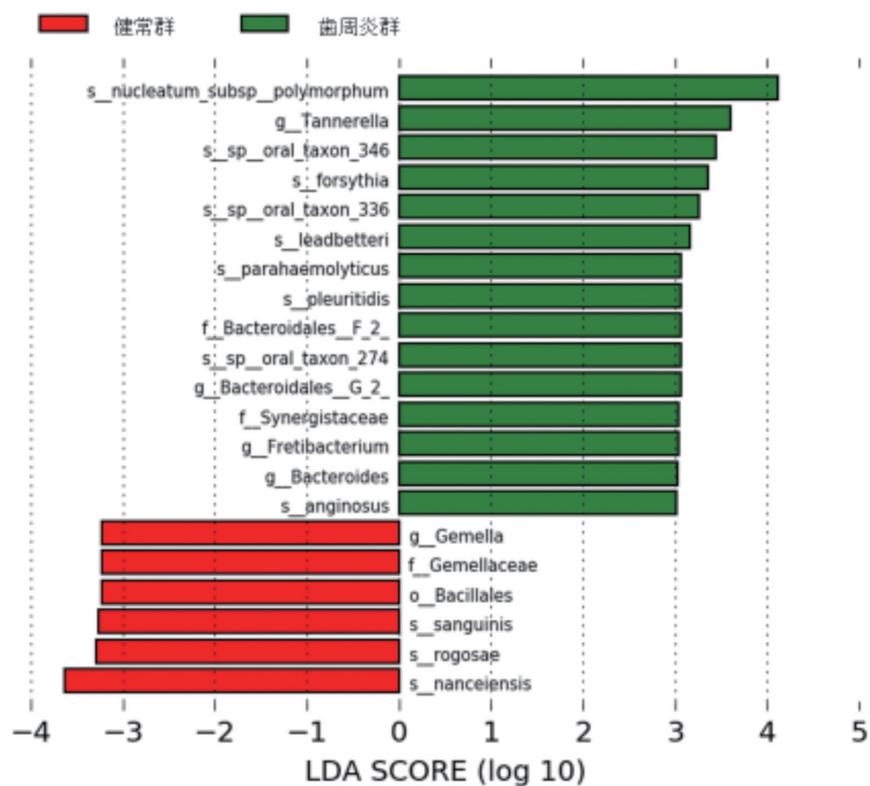


図3 Linear discriminant analysis effect size の結果  
s, species ; g, genus ; f, family ; o, order

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

今後論文投稿予定。