

歯周炎罹患の有無によるアテローム性動脈硬化病変の

細菌叢のメタゲノム解析

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻

病態機構学講座 歯周病態学分野

磯島 大地

**Meta-genomic analysis of microbiome in atheroma from the patients
with/without periodontitis**

Department of Pathophysiology - Periodontal Science, Okayama University

Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Daichi ISOSHIMA

(平成 29 年 12 月 15 日受付)

緒 言

ヒトの生体内には様々な細菌が存在しており，現在，それら細菌叢全体はマイクロバイオーームと呼ばれている¹⁾。我々はこれらマイクロバイオーームと共存し，細菌と細胞との相互作用を介して生体機能は生理的にコントロールされている。マイクロバイオーームのバランス崩壊は，肥満や様々な癌，腸疾患，精神障害などの発症に関与すると考えられている^{2,3)}。これら疾患と同様に，歯周炎も口腔内におけるマイクロバイオーームのバランス崩壊が原因で発症する疾患の一つと考えられている⁴⁾。歯面に付着したマイクロバイオーームに対する生体防御反応として歯周組織において炎症反応が生じるが，その炎症が過剰になると自己組織が破壊され，その結果歯周ポケットの形成が生じる。この歯周ポケット内では，嫌気性菌を中心としたマイクロバイオーームが薬剤や免疫機能に対し抵抗性を備えたバイオフィルムを構成し，変化・成熟しながら更なる組織破壊を助長して歯周炎が進行する⁵⁾。このように歯周炎は口腔内マイクロバイオーームのバランス崩壊が原因の感染症という側面と，細菌感染の結果生じる軽微慢性炎症性疾患という側面の二面性を有している。

歯周炎が保有するその二面性が様々な全身疾患に影響すると考えられており，

現在までに糖尿病，動脈硬化，心臓弁疾患，脳疾患，低体重児早産，癌，非アルコール性脂肪肝炎（NASH）などとの関連性が示唆されている⁶⁻¹¹⁾。我々も歯周病原細菌を中心としたマイクロバイオーームが原因で感染性心内膜炎が生じた可能性が高い症例について報告を行った¹²⁾。これら全身疾患の中で，アテローム性動脈硬化症は動脈硬化の一種であり，様々な原因によって血管内壁にアテローム性プラークが沈着する循環器疾患である¹³⁾。アテローム性動脈硬化症と歯周炎との関連性は，疫学的分析やアテロームプラーク中からの歯周病原細菌の検出によって相関関係が示唆されている¹⁴⁻¹⁶⁾。しかし，2012年のアメリカ心臓協会の声明において，アテローム性動脈硬化症などの虚血性心疾患と歯周炎との関連性は認められるが因果関係は証明されていないと位置付けられている¹⁷⁾。その理由として，歯周炎とアテローム性動脈硬化症などの虚血性心疾患の発症や進行には，糖尿病，高血圧症，脂質異常症，喫煙といった多数の共通交絡因子が存在すること^{18, 19)}，また，歯周病原細菌がアテローム性動脈硬化病変の発症に直接関与することを証明した報告が不足していることがあげられる¹⁷⁾。

アテローム性動脈硬化症の発症と歯周炎に関する研究は，*Porphyromonas gingivalis* を用いた動物モデルを中心に行われてきた²⁰⁾。また，臨床研究におい

では、アテローム性動脈硬化病変部から数種の歯周病原細菌 DNA が検出されたといったものが主であった²¹⁾。しかし、常在菌を含めたマイクロバイオームの崩壊が様々な疾患を起炎させる引き金となっていることを考慮すると、歯周炎とアテローム性動脈硬化症の相関を探求するには、少数種の細菌の発症関与を調べるのみではなく、両疾患において多数種の細菌を標的とした網羅的なマイクロバイオーム解析が必須であると考えられる。

マイクロバイオーム解析は、以前は培養法²²⁾によるものが主であったが、近年 16S ribosomal RNA (rRNA) 遺伝子を用いた網羅的な細菌群集解析手法²³⁾によって難培養性で検出が困難であった細菌に関しても解析することが可能となった。16S rRNA 遺伝子は全ての細菌種に存在している遺伝子²⁴⁾であり、その塩基配列を解読し、データベースと照合することで、細菌種の同定が可能となる。さらに次世代シーケンス解析²⁵⁾が広く普及してきたことから、一度に多検体かつ大容量のシーケンスデータを解析することが可能となり、マイクロバイオームに関する研究は急速に進歩してきている。

そこで本研究は、口腔内とアテローム動脈硬化部の細菌叢を、次世代シーケンスを用いて網羅的に解析することにより、両疾患の関連性を細菌学的に検

討することを目的とした。

対象および方法

本研究は、岡山大学研究倫理審査専門委員会の承認（承認番号 1603-059）、脳神経センター大田記念病院研究倫理専門委員会（承認番号 121）のもと、対象被験者に同意を得た上、下記の研究を行った。

1. 対象被験者

2016年4月から2016年11月までの期間、広島県福山市の脳神経センター大田記念病院を受診した内頸動脈狭窄症患者のうち、本研究の条件を満たす12名を対象被験者とした。対象被験者の選出条件は以下に示す通りである。

- ① 研究参加の同意を本人、または代諾者から文書で取得可能な患者
- ② 同意取得時の年齢が40歳以上である患者
- ③ 内頸動脈狭窄症の診断を受け、頸動脈血栓内膜剥離術（CEA：carotid endarterectomy）を受ける患者
- ④ 現在歯数が10歯以上である患者

2. 対象被験者の分類

対象被験者に対して歯周組織検査 {平均歯周ポケット深さ、プロービング時

の出血（BOP）陽性率} および歯周病原細菌に対する血清 IgG 抗体価検査のための採血を行った。歯周組織検査の結果から、日本歯周病学会ガイドライン（歯周治療の指針 2015）に基づいて患者を 1 口腔単位で評価し、以下の 3 群に分類した（図 1）。

- ① 中等度または重度歯周炎患者（Periodontitis : 4 名）
- ② 軽度歯周炎患者（4 名）
- ③ 非歯周炎患者（Control : 4 名）

3. サンプル採取

上記の①と③の群の患者からのみ以下のサンプルを採取した。

- ・アテローム性プラーク：CEA 施行時に外科的に摘出した。
- ・歯周ポケットプラーク：歯周ポケット値の最深部にペーパーポイント（United Dental Manufactures, Inc., Johnson City, TN, USA）を挿入し採取した。
- ・舌表面唾液：舌表面から Forensic Swab（Sarsted AG & Co., Nümbrecht, Germany）

を用いてスワブ法にて採取した。

各種サンプルは採取後すぐに -40°C で冷凍し、冷凍状態で岡山大学歯周病態学分野に輸送した後、 -80°C で保管した。取得したサンプルおよび患者情報は、

脳神経センター大田記念病院に勤務している研究分担者が、全研究対象者に符号を付し、本研究実施者にブラインドした状態で精査・解析した。

4. 細菌 DNA の抽出

上記のサンプルから DNA 抽出キット (QIAamp DNA Microbiome Kit, Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、添付説明書に従い細菌 DNA を抽出した。具体的には、50 mg のアテローム性プラークを氷上のペトリ皿の上で細断し、1 mL のリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffer saline : PBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で懸濁した。また、歯周ポケットプラークおよび舌表面唾液は、それぞれ 1 mL の PBS 中でペーパーポイントおよび Forensic Swab を懸濁し、上清を回収した。これら懸濁液に、Reagent DX (Qiagen) を含んだ 200 μ L の ATL Buffer (Qiagen) を 0.1 mm シリカビーズ入りチューブ (Lysing Matrix B, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) に加えた後、Fast Prep 24 (MP Biomedicals) を用いてホモジナイズ (45 秒, 6.5 m/s, 3 回) を行った。ホモジナイズの前後ではプロテイナーゼ K (Qiagen) を用いたタンパク質の溶解処理 (56 °C, 30 分) を行った。その後、通法に従い精製し、50 μ L の Buffer AVE (Qiagen) で細菌 DNA を溶出し、-80 °C で保管した。

5. 次世代シーケンス（メタゲノム）解析

次世代シーケンス解析は岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯周病態学分野及び岡山大学病院バイオバンク バイオ検体管理・バイオマーカー解析センターにて行った。まず，細菌 DNA 中に存在する 16S rRNA 遺伝子中の特定領域（1352 bp）を polymerase chain reaction（PCR）法で増幅した。具体的には，細菌 DNA 溶液 2.5 μ L を鋳型とし，KAPA HiFi HotStart ReadyMix 12.5 μ L（Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA），Forward プライマー（27 Forward : AGAGTTTGATCCTGGCTCAG）1.0 μ L，Reverse プライマー（1378 Reverse : CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG）1.0 μ L を含む PCR 反応液 25 μ L を，Illumina 社（San Diego, CA, USA）推奨の反応条件（初期熱変性を 98 $^{\circ}$ C，3 分，サイクリングは熱変性を 98 $^{\circ}$ C，30 秒，アニーリングを 55 $^{\circ}$ C，30 秒，伸長反応を 72 $^{\circ}$ C，30 秒で 25 サイクル，最終伸長反応は 72 $^{\circ}$ C，5 分）で増幅反応を行った。この PCR 産物を鋳型として，V3-4 領域（460 bp）を対象とした 2 回目の PCR 反応を行った。具体的には 1 回目の PCR の反応液 2.5 μ L，KAPA HiFi HotStart ReadyMix 12.5 μ L，Forward プライマー（TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG）5.0 μ L，Reverse プライマー（GTCTCGT-

GGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC) 5.0

μLを含む計 25 μL を用いて、上記と同じ条件で増幅反応を行った。DNA の質および量に関しては、随時 Qubit フルオロメーター (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) および D1000 ScreenTape (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて測定を行った。

その後、次世代シーケンサー Illumina MiSeq[®] (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) を使用して、各サンプルの塩基配列の解読を行った。得られた塩基配列を CLC Genomics Workbench (CLC bio, Aarhus, Denmark) を用いてデータベースに照合した後、統計分析ソフト R (Ver.3.3.2) を使用し、主成分分析²⁶⁾ とクラスター分析²⁶⁾ を行った。さらに、統計分析ソフト QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) を使用し、アテローム性プラークの細菌叢の詳細を検討するために、両群においてマイクロバイオーームを形成している細菌の中から、高い割合で検出された 15 菌種 (OTU : Operational Taxonomic unit) を選択し、相関係数 0.4 以上で共起ネットワーク分析²⁷⁾ を行った。

6. 血清 IgG 抗体価検査

採血した血液は血清に分離後、-80 °C にて凍結保存した。その後、村山らの

記載²⁸⁾に従い、酵素抗体法 (ELISA) 法によって歯周病原細菌に対する血清 IgG 抗体価の測定を行った。検査対象の歯周病原細菌は、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4, ATC29523 そして SUNY67, *Eikenella corrodens* FDC1073, *Fusobacterium nucleatum* ATCC25586, *Prevotella intermedia* ATCC25611 および *Prevotella nigrescens* ATCC33563, *Capnocytophaga ochracea* S3, *Porphyromonas gingivalis* FDC381 および SU63, *Treponema denticola* ATCC35405 および *Tannerella forsythia* ATCC43037 とした。具体的には、これらの菌株を超音波破砕した後に、上清画分を抗原とした固相化した測定プレートを作成した。次に、対象被験者の希釈血清をプレートに滴下し、血清中に含まれる抗体を特異的に認識するアルカリフォスファターゼ標識ヒト IgG 抗体で認識させ、発色させた後の吸光度を測定した²⁹⁾。

7. 全身状態と歯周炎罹患状態の評価方法

CEA の術前検査結果で両群間の年齢、性別や交絡因子となり得る炎症マーカー、高血圧症、脂質異常症、そして糖尿病の検査値を評価した (表 1)。

また、歯周組織検査と歯周病原細菌に対する血清 IgG 抗体価検査から、両群

の現在歯数と歯周炎罹患状態を評価した（表 2）。なお、血清 IgG 抗体価検査において、*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* は異なる複数の菌株で実施した。

8. 統計解析

統計解析は、統計ソフト SPSS Ver.23（IBM, 東京, 日本）を使用し、統計処理は Mann-Whitney *U* Test にて行った。統計学的有意水準は 5%未満とした。

結 果

1. 対象被験者の特徴と歯周炎罹患状態

Control 群と Periodontitis 群の間で、年齢、性別、炎症マーカー（CRP 値と白血球数）、高血圧症、脂質異常症、糖尿病の検査値（血圧、コレステロール値、中性脂肪値、HbA1c 値）に関して有意差は見られなかった（表 1）。両群間において、歯周組織検査の結果から平均歯周ポケット深さは有意な差が認められたが、BOP 陽性率は有意な差は見られなかった（表 2）。血清抗体価検査の結果から、Control 群と比較して Periodontitis 群では *A. actinomycetemcomitans* 3 菌株 (Y4, ATCC29523, SUNY67), *C. ochracea*, そして *P. gingivalis* (FDC381) の血清 IgG 抗体価が有意に高かった（表 2）。

2. マイクロバイオーム組成分析

- ・ 歯周ポケットプラークのマイクロバイオーム組成

歯周ポケットプラークのマイクロバイオームは、Control 群と比較して Periodontitis 群では口腔内が健康な状態である時に観察される *Rothia* 属や *Neisseria* 属などの常在細菌の割合が少なく、歯周病原細菌である *Fusobacterium*

属や *Filifactor* 属といった病原細菌の割合が多かった (図 2A, B)。特に, 近年
歯周ポケットから検出が報告されている *Desulfobulbus* 属³⁰⁾ は Control 群と比較
して Periodontitis 群で有意に多かった (図 2B)。

- ・ 舌表面唾液マイクロバイオーーム組成

両群の舌表面唾液のマイクロバイオーームは, 歯周ポケットプラークのマイク
ロバイオーームと類似していたが, 歯周ポケットほど顕著な差は見られなかった
(図 3A, B)。その中で, 病原細菌として報告されている *Filifactor* 属は Control
群と比較して Periodontitis 群で有意に多かった (図 3B)。

- ・ アテローム性プラークマイクロバイオーーム組成

アテローム性プラークマイクロバイオーームは, 中心となり大部分を占めてい
る細菌は土壌細菌の一種である *Burkholderiales* 目, *Bacillales* 目, *Rhizobiales* 目
などで, その割合は両群間で類似していた。その中で, Control 群と比較して
Periodontitis 群でヒトの常在細菌である *Sphingomonadales* 目の割合が多かった
(図 4)。

3. 主成分分析

主成分分析の結果, Control 群と Periodontitis 群の舌表面唾液のマイクロバイオーームは類似しており, また Control 群の歯周ポケットプラークのマイクロバイオーームも両群の舌表面唾液のマイクロバイオーームと類似していた。

一方で, Control の被験者 4 と Periodontitis の被験者 1 は各群において他の対象被験者と異なる傾向を示したが, 総じて Periodontitis 群の歯周ポケットプラークのマイクロバイオーームは Control 群と比較し, 異なる傾向を示した。

また, 口腔内とアテローム性プラークのマイクロバイオーームの組成は全く異なっていた (図 5)。

4. クラスタ分析

クラスタ分析の結果, 口腔内とアテローム性プラークのマイクロバイオーームの組成は主成分分析結果と同様に全く異なっていた。しかし, アテローム性プラークのマイクロバイオーーム組成は, Control 群と Periodontitis 群間で変化する傾向が観察された (図 6)。

5. アテローム性プラークマイクロバイオーームの共起ネットワーク分析

アテローム性プラークにおいて共起ネットワーク分析を行いマイクロバイオームの相関関係を評価した。分析の結果、Control 群、Periodontitis 群ともネットワークを形成している中心細菌は、*Agrobacterium* 属、*Delftia* 属、*Rhizobium* 属であった。また、これら細菌は高い割合を占めている細菌と同種であり、過去の報告とも類似した傾向が観察された²⁶⁾。しかし、Periodontitis 群では、Control 群でも観察された *Cutibacterium acnes* を中心した相関関係において変化が見られた (図 7)。

考 察

ヒトには、常在菌種が約 1,000 種類、総菌量として数 100 兆～1,000 兆個が存在し、口腔内には約 100 億個のマイクロバイオーームが存在・共存している³¹⁾。

歯周炎は、口腔内のマイクロバイオーームが歯周組織に感染することによって発症する感染症であり、また、様々な全身疾患との関連が明らかになっているが、依然としてその詳細なメカニズムに関しては不明な点が多い¹⁷⁾。歯周炎の病原因子としてこれまで Red complex species (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*) などの単一な病原性細菌を対象に研究・臨床が行われてきた³²⁾。過去の知見から Red complex species が歯周炎の発症に関与していることは明らかであるが、Red complex species を代表とする特定の病原細菌種のみが歯周炎の発症に関与しているわけではなく、実際には様々な細菌による混合感染が要因となることが報告されている³³⁾。また、2014 年の Perez-Chaparro らの報告³⁴⁾ によると新たに *Filifactor alosis* を始めとする 17 菌種が、歯周炎を引き起こす病原性を有している可能性が示唆されており、これらのことから歯周炎の病因を単独の細菌種検出で説明することは不可能であると考えられる。

歯周炎の病因であるマイクロバイオーームの理解をさらに困難にしている要因

として、個体ごとに異なる常在菌の存在が考えられる。通常、歯周病原細菌は常在菌と共に口腔内のマイクロバイオーームを構築し、生態系の維持を担っていると考えられる³⁵⁾。しかし、病原性要因が生じ病原細菌の増加や病原性の変化が引き起こされると、常在菌と病原細菌が保ってきた生態系の維持関係は破綻し、病気が引き起こされると考えられる。これらのことを考慮すると、歯周炎と様々な全身疾患との関連を詳細に探求するためには、病原細菌に加え常在菌を含めた網羅的なマイクロバイオーームの把握は不可欠であると考ええる。

本研究では、内頸動脈狭窄症患者を歯周炎の罹患状態で Control 群と Periodontitis 群に分類し、両群の舌表面唾液、歯周ポケットプラーク、およびアテローム性プラークのマイクロバイオーームを次世代シーケンス解析で分析した。口腔内のマイクロバイオーームは、Control 群と比較して Periodontitis 群では歯周病原細菌である *Fusobacterium* 属や *Filifactor* 属の割合が増加する傾向を示していた。特に舌表面唾液では歯周炎の罹患の有無により *Filifactor* 属の割合に有意な違いがみられた。一方、健常者の常在細菌として示唆されている *Rothia* 属や *Neisseria* 属は、Control 群と比較して Periodontitis 群の歯周ポケットプラークではその割合が減少していた^{36, 37)}。舌表面唾液より歯周ポケットプラークにおい

て、病原細菌が増加し常在細菌が減少する傾向は顕著であった。

さらに、本研究では血行性に侵入した歯周病原細菌が直接的に頸動脈のアテロームを形成する仮説を立て、頸動脈アテローム性プラークと口腔内のマイクロバイオーームを次世代シーケンス解析で細菌学的に比較した。これまでの報告により、*P. gingivalis* が血管内皮細胞に作用し血管壁に接着分子である vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) を発現させ血中のマクロファージの血管壁への侵入を促すことや³⁸⁾、血小板を凝集させて血栓を形成する作用があることが知られている³⁹⁾。また、apolipoprotein E (ApoE) 遺伝子を欠損させたマウスに高脂質食を投与後に *P. gingivalis* を静脈から投与すると大動脈壁にアテローム性プラークが形成されることが報告されている²⁰⁾。近年、ヒトにおいてもアテローム性プラークのマイクロバイオーームについて様々な報告がされつつあるが、歯周炎の罹患状態を把握した上、口腔内プラークとアテローム性プラークの両部位で次世代シーケンス解析を使用し、網羅的なマイクロバイオーームの関連性を探求した報告はない。

そこで本研究では、口腔内とアテローム性プラークのマイクロバイオーームを主成分分析、クラスター分析、および組成分析で評価した。その結果、歯周炎

罹患の有無によらず、アテローム性プラークのマイクロバイオーム内の口腔内細菌の割合は著しく低く、口腔内マイクロバイオームと全く異なる傾向が観察された。本研究の結果と異なり既報の報告の幾つかでは、アテローム性プラークから口腔内細菌が検出されている。一方で、*P. gingivalis* を経口感染させた動物モデルにおいて、大動脈壁のアテローム性プラークの形成が促進されたが、病変部からは *P. gingivalis* は検出されていないとの報告もある⁴⁰⁾。本研究の結果からは、アテローム性動脈硬化病変部に歯周病原細菌を含む口腔内細菌の割合は著しく低く、マイクロバイオームも全く異なっていた。従って、血管内に侵入した口腔内細菌が、血管内壁に直接影響を及ぼし、アテローム性プラーク形成を引き起こした可能性は低いと考えられる。

さらに、共起ネットワーク分析において、アテローム性プラークのマイクロバイオームの各菌における相関関係を精査したところ、両群とも中心的にネットワークを形成している細菌種は *Agrobacterium* 属、*Delftia* 属、*Rhizobium* 属であった。これらの細菌種は、土壌細菌などの環境細菌も含んでいるが、過去の文献報告でもアテローム性プラークから検出されており、本研究結果におけるアテローム性プラークのマイクロバイオーム分析は適切であったと考えられる

26)。一方で、共起ネットワーク分析から Control 群で中心的にネットワークを形成していた *C. acnes* は、Periodontitis 群では他の菌との相関関係に変化が見られた。*C. acnes* は皮膚や腸内の常在細菌として知られているが、本研究と同様にアテローム性プラークからの検出例も報告されている⁴¹⁾。一方、サルコイドーシス、敗血症、および感染性心内膜炎の起炎菌になる一面も報告されており、動物モデルにおいて *C. acnes* の加熱死菌を投与することで生じるリポ多糖 (lipopolysaccharide : LPS) 感受性の亢進は、interleukin-12 (IL-12) や interferon gamma (IFN γ) による Toll-like receptor 4 (TLR4) 発現増強に起因することが報告されている⁴²⁾。従って、歯周病原細菌の LPS が *C. acnes* を介してその病態を悪化させる可能性が考えられる。これらのことから、歯周炎の罹患によりアテローム動脈硬化病変部の菌叢ネットワークに変化が見られたことは、口腔内から LPS などの菌体成分の血行性伝播や、微小慢性炎症による全身的な影響が間接的に関与した可能性が示唆される。また、近年ではアテローム性動脈硬化症を促進させる代謝物質である trimethylamine-N-oxide (TMAO) の再生は、腸内マイクロバイオームの代謝に依存し、心血管有害事象の発現リスクと関連することが報告されている⁴³⁾。このような報告からも、生体における様々な箇所のマ

マイクロバイオーームバランス変化はアテローム性動脈硬化症に関連することが伺える。しかし、その詳細に関しては依然不明な点が多いため、今後は被験者数を増加させ、アテローム性プラークにおける細菌の感染源やマイクロバイオーームの相関性を変化させる要因を検討する必要がある。

結 論

本研究結果から、アテローム性動脈硬化症の発症には、血行性に体内に侵入した口腔内細菌が直接影響を及ぼすのではなく、歯周炎感染がアテローム性プラークのマイクロバイオーームにおいて細菌の生態系構成を変化させて間接的に関与している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の高柴正悟教授に深甚なる謝意を表します。また，様々な面にわたり終始御指導賜り，貴重な御助言と御協力を下さいました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の山城圭介助教，様々な面にわたり貴重な御助言と御協力を下さいました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科の富田秀太准教授，香川県高松市谷口歯科医院マイクロバイオー姆センターの谷口誠先生，脳神経センター大田記念病院歯科の松永一幸先生，ならびに歯周病態学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

表題脚注

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯

周病態学分野

(指導：高柴正悟教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

- 第 60 回春季日本歯周病学会学術大会 (2017 年 5 月, 福岡)
- 第 10 回日本口腔検査学会総会・学術大会 (2017 年 9 月, 新潟), 学術大会
ポスター賞 (会長賞) 受賞
- 第 147 回秋季日本歯科保存学会学術大会 (2017 年 10 月, 岩手)

参考文献

- 1) Grogan, D.: The Microbes Within. *Nature*, **518**, S2, 2015.
- 2) Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R. and Gordon, J.I.: An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, **444**, 1027-1031, 2006.
- 3) Sharon, G., Garg, N., Debelius, J., Knight, R., Dorrestein, P.C. and Mazmanian, S.K.: Specialized metabolites from the microbiome in health and disease. *Cell Metab.*, **20**, 719-730, 2014.
- 4) Griffen, A.L., Beall, C.J., Campbell, J.H., Firestone, N.D., Kumar, P.S., Yang, Z.K., Podar, M. and Leys, E.J.: Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME. J.*, **6**, 1176-1185, 2012.
- 5) Maddi, A. and Scannapieco, F.A.: Oral biofilms, oral and periodontal infections, and systemic disease. *Am. J. Dent.*, **26**, 249-254, 2013.
- 6) Lalla, E. and Papapanou, P.N.: Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.*, **7**, 738-748, 2011.
- 7) Senba, T., Kobayashi, Y., Inoue, K., Kaneto, C., Inoue, M., Toyokawa, S., Suyama, Y., Suzuki, T., Miyano, Y. and Miyoshi, Y.: The association between self-reported periodontitis and coronary heart disease -from MY Health Up

Study-. *J. Occup. Health*, **50**, 283-287, 2008.

- 8) Lafon, A., Pereira, B., Dufour, T., Rigouby, V., Giroud, M., Béjot, Y. and Tubert-Jeannin, S.: Periodontal disease and stroke: a meta-analysis of cohort studies. *Eur. J. Neurol.*, **21**, 1155-1161, 2014.
- 9) Zeng, X.T., Deng, A.P., Li, C., Xia, L.Y., Niu, Y.M. and Leng, W.D.: Periodontal disease and risk of head and neck cancer: a meta-analysis of observational studies. *PLoS One*, **8**, e79017, 2013.
- 10) Yoneda, M., Naka, S., Nakano, K., Wada, K., Endo, H., Mawatari, H., Imajo, K., Nomura, R., Hokamura, K., Ono, M., Murata, S., Tohnai, I., Sumida, Y., Shima, T., Kuboniwa, M., Umemura, K., Kamisaki, Y., Amano, A., Okanoue, T., Ooshima, T. and Nakajima, A.: Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.*, **12**, 16, 2012.
- 11) Sanz, M. and Kornman, K.: Working group 3 of joint EFP/AAP workshop. Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J. Periodontol.*, **84**, S164-169, 2013.
- 12) Isoshima, D., Yamashiro, K., Matsunaga, K., Shinobe, M., Nakanishi, N., Nakanishi, I., Omori, K., Yamamoto, T. and Takashiba, S.: Assessment of pathogenesis of infective endocarditis by plasma IgG antibody titer test against

periodontal bacteria. *Clin. Case Rep.*, **5**, 1580-1586, 2017.

- 13) Ross, R.: Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.*, **340**, 115-126, 1999.
- 14) Bahekar, A.A., Singh, S., Saha, S., Molnar, J. and Arora, R.: The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. *Am. Heart J.*, **154**, 830-837, 2007.
- 15) Ishihara, K., Nabuchi, A., Ito, R., Miyachi, K., Kuramitsu, H.K. and Okuda, K.: Correlation between detection rates of periodontopathic bacterial DNA in coronary stenotic artery plaque [corrected] and in dental plaque samples. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 1313-1315, 2004.
- 16) Okuda, K., Ishihara, K., Nakagawa, T., Hirayama, A. and Inayama, Y.: Detection of *Treponema denticola* in atherosclerotic lesions. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 1114-1117, 2001.
- 17) Lockhart, P.B., Bolger, A.E., Papapanou, P.N., Osinbowale, O., Trevisan, M., Levison, M.E., Taubert, K.A., Newburger, J.W., Gornik, H.L., Gewitz, M.H., Wilson, W.R., Smith, S.C, Jr. and Baddour, L.M.: American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Epidemiology and Prevention, Council on Peripheral Vascular Disease, and Council on Clinical Cardiology: Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the

- evidence support an independent association ? : a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, **125**, 2520-2544, 2012.
- 18) Hujoel, P.P., Drangsholt, M., Spiekerman, C. and DeRouen, T.A.: Periodontal disease and coronary heart disease risk. *JAMA*, **284**, 1406-1410, 2000.
 - 19) Peacock, M.E. and Carson, R.E.: Frequency of self-reported medical conditions in periodontal patients. *J. Periodontol.*, **66**, 1004-1007, 1995.
 - 20) Li, L., Messas, E., Batista, E.L, Jr., Levine, R.A. and Amar, S.: *Porphyromonas gingivalis* infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. *Circulation*, **105**, 861-867, 2002.
 - 21) Kurihara, N., Inoue, Y., Iwai, T., Umeda, M., Huang, Y. and Ishikawa, I.: Detection and localization of periodontopathic bacteria in abdominal aortic aneurysms. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, **28**, 553-558, 2004.
 - 22) Papapanou, P.N., Sellén, A., Wennström, J.L. and Dahlén, G.: An analysis of the subgingival microflora in randomly selected subjects. *Oral Microbiol. Immunol.*, **8**, 24-29, 1993.
 - 23) Goodrich, J.K., Waters, J.L., Poole, A.C., Sutter, J.L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J.T., Spector, T.D., Clark, A.G. and Ley, R.E.: Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, **159**, 789-799, 2014.

- 24) Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H. and Saito, M.: Molecular approaches to studying microbial communities: targeting the 16S ribosomal RNA Gene. *J. UOEH*, **38**, 223-232, 2016.
- 25) Buffie, C.G., Bucci, V., Stein, R.R., McKenney, P.T., Ling, L., Gobourne, A., No, D., Liu, H., Kinnebrew, M., Viale, A., Littmann, E., van den Brink, M.R., Jenq, R.R., Taur, Y., Sander, C., Cross, J.R., Toussaint, N.C., Xavier, J.B. and Pamer, E.G.: Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature*, **517**, 205-208, 2015.
- 26) Ziganshina, E.E., Sharifullina, D.M., Lozhkin, A.P., Khayrullin, R.N., Ignatyev, I.M. and Ziganshin, A.M.: Bacterial communities associated with atherosclerotic plaques from Russian individuals with atherosclerosis. *PLoS One*, **11**, e0164836, 2016.
- 27) Shi, W., Qin, M., Chen, F. and Xia, B.: Supragingival Microbial Profiles of Permanent and Deciduous Teeth in Children with Mixed Dentition. *PLoS One*, **11**, e0146938, 2016.
- 28) Murayama, Y., Nagai, A., Okamura, K., Kurihara, H., Nomura, Y., Kokeyuchi, S. and Kato, K.: Serum immunoglobulin G antibody to periodontal bacteria. *Adv. Dent. Res.*, **2**, 339-345, 1988.
- 29) Kudo, C., Naruishi, K., Maeda, H., Abiko, Y., Hino, T., Iwata, M., Mitsuhashi, C., Murakami, S., Nagasawa, T., Nagata, T., Yoneda, S., Nomura, Y., Noguchi, T.,

- Numabe, Y., Ogata, Y., Sato, T., Shimauchi, H., Yamazaki, K., Yoshimura, A. and Takashiba, S.: Assessment of the plasma/serum IgG test to screen for periodontitis. *J. Dent. Res.*, **91**, 1190-1195, 2012.
- 30) Oliveira, R.R., Fermiano, D., Feres, M., Figueiredo, L.C., Teles, F.R., Soares, G.M. and Faveri M.: Levels of candidate periodontal pathogens in subgingival biofilm. *J. Dent. Res.*, **95**, 711-718, 2016.
- 31) Sender, R., Fuchs, S. and Milo, R.: Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol.*, **14**, e1002533, 2016.
- 32) Socransky, S.S., Smith, C. and Haffajee, A.D.: Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, **29**, 260-268, 2002.
- 33) Page, R.C. and Kornman, K.S.: The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol. 2000*, **14**, 9-11, 1997.
- 34) Pérez-Chaparro, P.J., Gonçalves, C., Figueiredo, L.C., Faveri, M., Lobão, E., Tamashiro, N., Duarte, P. and Feres M.: Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. *J. Dent. Res.*, **93**, 846-858, 2014.
- 35) Takeshita, T., Nakano, Y., Kumagai, T., Yasui, M., Kamio, N., Shibata, Y., Shiota, S. and Yamashita, Y.: The ecological proportion of indigenous bacterial populations in saliva is correlated with oral health status. *ISME. J.*, **3**, 65-78, 2009.

- 36) Wang, J., Qi, J., Zhao, H., He, S., Zhang, Y., Wei, S. and Zhao, F.: Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease. *Sci. Rep.*, **3**, 1843, 2013.
- 37) Takeshita, T., Matsuo, K., Furuta, M., Shibata, Y., Fukami, K., Shimazaki, Y., Akifusa, S., Han, D.H., Kim, H.D., Yokoyama, T., Ninomiya, T., Kiyohara, Y. and Yamashita, Y.: Distinct composition of the oral indigenous microbiota in South Korean and Japanese adults. *Sci. Rep.*, **4**, 6990, 2014.
- 38) Khlgatian, M., Nassar, H., Chou, H.H., Gibson, F.C, 3rd. and Genco, C.A.: Fimbria-dependent activation of cell adhesion molecule expression in *Porphyromonas gingivalis*-infected endothelial cells. *Infect. Immun.*, **70**, 257-267, 2002.
- 39) Imamura, T., Travis, J. and Potempa, J.: The biphasic virulence activities of gingipains: activation and inactivation of host proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **4**, 443-450, 2003.
- 40) Jain, A., Batista, E.L, Jr., Serhan, C., Stahl, G.L. and Van Dyke, T.E.: Role for periodontitis in the progression of lipid deposition in an animal model. *Infect. Immun.*, **71**, 6012-6018, 2003.
- 41) Koren, O., Spor, A., Felin, J., Fåk, F., Stombaugh, J., Tremaroli, V., Behre, C.J., Knight, R., Fagerberg, B., Ley, R.E. and Bäckhed, F.: Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*,

108, 4592-4598, 2011.

- 42) Tsutsui, H., Imamura, M., Fujimoto, J. and Nakanishi, K.: The TLR4/TRIF-mediated activation of nlrp3 inflammasome underlies endotoxin-induced liver injury in mice. *Gastroenterol. Res. Pract.*, **2010**, 641865, 2010.
- 43) Tang, W.H., Wang, Z., Levison, B.S., Koeth, R.A., Britt, E.B., Fu, X., Wu, Y. and Hazen, S.L.: Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.*, **368**, 1575-1584, 2013.

図の説明

図 1 対象被験者の分類

図 2 歯周ポケットプラークマイクロバイオーーム組成

(A) 次世代シーケンス解析で得られたデータから、両群の歯周ポケットマイクロバイオーームにおいて、高い割合で検出された 13 菌属を中心に組成を分析し評価した。

(B) 歯周ポケットプラークマイクロバイオーームにおいて、口腔常在菌を含めた割合の差異を評価した。 * : $p < 0.05$, Mann-Whitney *U* Test

なお、(A) と (B) 共に各群 4 名ずつから得られた結果の平均値を示し、菌種においては属レベルで評価した。

図 3 舌表面唾液マイクロバイオーーム組成

(A) 次世代シーケンス解析で得られたデータから、両群の舌表面唾液マイクロバイオーームにおいて、高い割合で検出された 13 菌属を中心に組成を分析し評価した。

(B) 舌表面唾液マイクロバイオーームにおいて、口腔常在菌を含めた割合の差異を評価した。* : $p < 0.05$, Mann-Whitney *U* Test

なお、(A) と (B) 共に各群 4 名ずつから得られた結果の平均値を示し、菌種においては属レベルで評価した。

図 4 アテローム性プラークマイクロバイオーーム組成

次世代シーケンス解析で得られたデータから、両群のアテローム性プラークマイクロバイオーームにおいて、高い割合で検出された 13 菌属を中心に組成を分析し評価した。また、本図は、両群 4 名ずつから得られた結果の平均値を示し、菌種においては目レベルで評価した。

図 5 主成分分析

次世代シーケンス解析で得られたデータから、統計分析ソフト R (Ver. 3.3.2) を使用し、両群の部位別におけるマイクロバイオーームの差異を主成分分析図で評価した。PC : Principal component

□は舌表面唾液、○は歯周ポケットプラーク、△はアテローム性プラーク

を示す。青字は Control 群 4 名を，赤字は Periodontitis 群 4 名を示し，数字は各群の患者を示す。

図6 クラスタ分析

次世代シーケンス解析で得られたデータから，統計分析ソフト R (Ver. 3.3.2) を使用し，両群の部位別におけるマイクロバイオームの差異をクラスタ分析図で評価した。

(S) は舌表面唾液，(P) は歯周ポケットプラーク，(AP) はアテローム性プラークを示す。青字は Control 群 4 名を，赤字は Periodontitis 群 4 名を示し，数字は各群の患者を示す。

図7 アテローム性プラークマイクロバイオームの共起ネットワーク分析

次世代シーケンス解析で得られたデータから，両群のアテローム性プラークマイクロバイオームにおいて高検出 15 菌種を選択し，共起ネットワーク分析で評価した。相関係数は 0.4 以上とした。また，分析には統計分析ソフト QIIME を使用した。

OTU : Operational Taxonomic unit

OTU_1 は *Agrobacterium* 属, OTU_2 は *Cutibacterium* 属, OTU_3 は *Delftia* 属, OTU_4 は *Rhizobium* 属を示す。