

## 日本人と韓国人の口腔保健状態および口腔常在細菌叢の国際比較

松尾, 和樹

<https://doi.org/10.15017/1441163>

---

出版情報：九州大学, 2013, 博士（歯学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：全文ファイル公表済



# 日本人と韓国人の口腔保健状態および 口腔常在細菌叢の国際比較

2013年

松尾和樹

九州大学大学院歯学府歯学専攻

九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座

歯科麻酔学分野

指導教員 横山 武志 教授

研究指導教員 山下 喜久 教授

## 対象論文

本研究の一部は、学術雑誌 *Nature Communications* に投稿中である（2013年12月5日投稿）。

Distinct composition of the oral indigenous microbiota in South Korean and Japanese adults.

Toru Takeshita, Kazuki Matsuo, Michiko Furuta, Yukie Shibata, Kaoru Fukami, Yoshihiro Shimazaki, Sumio Akifusa, Dong-Hung Han, Hyun-Duck Kim, Takeshi Yokoyama, Toshiharu Ninomiya, Yutaka Kiyohara, Yoshihisa Yamashita

## 目次

1. 要旨	1
2. 背景	2
3. 対象および方法	5
1) 研究対象	
2) 調査方法	
3) 唾液細菌叢の分析	
4. 結果	13
1) 分析対象者の属性	
2) 口腔の健康状態の比較	
3) T-RFLP 法を用いた両集団の唾液中細菌構成の比較	
4) バーコードパイロシーケンシング法による解析	
5. 考察	35
6. 総括	40
7. 謝辞	41
8. 参考文献	42

## 1. 要旨

日本人と韓国人は遺伝的に極めて近縁であり、その社会的背景にも数多くの類似点が認められる。にもかかわらず両国の国家統計を比較してみると、韓国人と比べ日本人は歯周炎罹患率が高い。そこで、我々は口腔マイクロバイオームの構成が両国で異なっているのではないかとの仮説を立て、福岡県久山町の住民 2272 名と京畿道楊平郡 (韓国) の住民 543 名から唾液を採取し、16S rRNA 遺伝子を用いてその細菌構成の比較を行った。全被験者の検体をフィンガープリンティング法の一つである Terminal restriction fragment length polymorphism 法を用いて解析し、得られたピークパターンを比較してみるとその細菌構成が両集団で有意に異なっていることが示唆された。さらに歯周炎の症状が全く認められない者 140 名に限って、Barcoded pyrosequencing 法による詳細な解析を行った場合も両集団の細菌構成の比率には大きな違いが認められ、韓国人に比べて日本人の口腔マイクロバイオームでは *Neisseria* の割合が少なく、*Prevotella*、*Veillonella* をはじめとする 19 菌属がより優勢であった。我々は以前の研究では歯周炎患者の唾液で *Prevotella*、*Veillonella* がより高比率を占めていることを指摘している。今回、歯周炎の症状が認められない口腔が比較的健康的な被検者に限った比較でも日本人と韓国人との間に同様の違いが認められることから、このような口腔常在マイクロバイオームの構成の違いが韓国人よりも日本人に歯周炎の有病率が高い理由である可能性を示唆している。

## 2. 背景

日本と韓国はともに東アジアに位置し日本海を挟んだ隣国である。両国とも国民のほとんどはモンゴロイド人種で構成されており、両国民はモンゴロイド人種のなかでも特に遺伝的に近縁であることが報告されている (Hugo Pan-Asian SNP Consortium *et al.*, 2009)。いずれの国も先進工業国として認知されており、一般的に国民の生活水準は高い。また平均余命の長さ (日本 82.9 歳、韓国 80.8 歳 (World Health Organization 2013))、出生率の低さ (合計特殊出生率、日本 1.4、韓国 1.4 (World Health Organization 2013))、収入の高さ (一人当たりの国民所得、日本 35,330 US ドル、韓国 30,370 US ドル(World Health Organization 2013))、高等教育を受ける人の割合 (日本 59%、韓国 64% (Organisation of Economic Co-operation and Development [OECD] 2013))など人口統計学および社会経済学的指標についても両国は極めて類似している。

世界保健機関 (World Health Organization、WHO) の報告によると日本の国民 1 万人あたりの歯科医師数は韓国に比べ多い (日本 7.4 人、韓国 5.0 人 (World Health Organization 2013))。国民皆保険は両国で施行されているが、日本の歯科に関する健康保険制度は義歯補綴など韓国に比べ幅広い領域をカバーしている。このような状況を鑑みると、日本人は韓国人と比べ気軽に歯科治療を受けることができる環境にあるといえる。さらに両国の国家統計の結果 (Korea Center for Disease Control and Prevention & Ministry of Health and Welfare 2008, Ministry of Health Labour and Welfare of Japan) を比較してみると、日本はデンタルフロスの使用者の割合 (日本 16.7%、韓国 11.7%)、歯間ブラシの使用者の割合 (日本 28.8%、韓国 9.5%) が韓国に比べ高く、現在喫煙している者の割合は韓国に比べ低い (日本 20.1%、韓国 39.1%) ことから、日本の成

人が韓国の成人と比べ口腔の健康に対する意識が低くはないと思われる。にもかかわらず、日本の成人の歯周炎の罹患率（20歳以上の歯周炎罹患率、2005年44.7%、2011年41.5% (Dental Health Division of Health Policy Bureau Ministry of Health Labour and Welfare Japan 2006, Dental Health Division of Health Policy Bureau Ministry of Health Labour and Welfare Japan 2012))は韓国の成人(20歳以上の歯周炎罹患率、2008年32.7%、2010年23.9% (Korea Center for Disease Control and Prevention & Ministry of Health and Welfare 2008, Korea Center for Disease Control and Prevention & Ministry of Health and Welfare 2010))に比べ明らかに高い。

歯周炎は歯の支持組織の破壊を引き起こす歯肉の炎症であり成人の歯の喪失の主たる原因の一つである。本疾患は歯肉溝に蓄積したデンタルプラークに含まれる細菌が関わる慢性感染症と考えられており、特に病巣から頻繁に検出される *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* や *Treponema denticola* などの細菌が直接の病原菌として認知されている(Socransky *et al.*, 1998)。一方で、*P. gingivalis* を specific pathogen-free (SPF) マウスに接種した場合には歯槽骨の減少が起こるのに対し、無菌マウスに接種した場合には歯槽骨の減少が起こらず、さらに *P. gingivalis* を接種したマウスでは細菌群集全体の構成に変化がみられる (Darveau *et al.*, 2012) ことから、近年歯周炎には特定の細菌種よりもむしろ細菌叢全体として関与している可能性が提唱されるようになってきている。我々も以前の研究においてこのような可能性を裏付けており、唾液中の主要な常在細菌の構成比率と歯周組織の健康状態とのあいだの関連を報告している (Takeshita *et al.*, 2009)。こうしたことから、我々は日本人と韓国人の歯周疾患の「罹りやすさ」の違いは両国民の口腔内に存在する細菌構成の違いによるものではないかという仮説を立てるに至った。

本研究では日本および韓国それぞれにおいて行われているコホート調査、久山町研究 と楊平郡研究において成人対象者の口腔健康状態の調査と唾液の採取を行った。唾液中の細菌群集は 16S rRNA 遺伝子を用いた分子生物学的手法を用いて解析を行い、両集団の細菌構成を比較した。

### 3. 対象および方法

#### 1) 研究対象

研究対象者は、日本人は 2007 年久山町研究の参加者、韓国人は 2011 年楊平郡研究の参加者とした。なお、本研究の遂行にあたっては九州大学医系部局地区臨床研究（観察研究）倫理審査委員会の承認およびソウル大学校歯医大学院倫理委員会の承認を受けた。

#### ①久山町研究

久山町研究では、1961 年から、福岡市に隣接した糟屋郡久山町の住民を対象に心血管疾患などの追跡調査を実施している。久山町の人口は約 8,000 人で、全国平均とほぼ同じ年齢・職業分布を持ち、平均的な日本人集団と考えられる (Hata *et al.*, 2013)。

追跡調査の一環として、2007 年に 40 歳以上の久山町住民を対象とした健康診査が実施され、口腔内診査も行われた。40 歳から 79 歳までの住民 2,861 人（全住民の 75.1%）が健康診査を受診した。このうち、口腔内診査を受けた者は 2,669 人で、データの欠落があった者や唾液採取ができなかった者 297 人を除外し、2,272 人（男性 1,011 人、女性 1,261 人）を久山町研究の分析対象者とした。

#### ②楊平郡研究

楊平郡研究は、韓国における心血管疾患ゲノム研究の一部として、2004 年から楊平郡で実施されている。楊平郡はソウルの郊外に位置し、ソウルから東に 45 km の場所にある。2010 年における楊平郡の全人口は 78,490 人で、40

歳から 79 歳までの人口は 45,298 人である。

楊平郡研究の第一期（ベースライン）は 2004 年から 2006 年に実施され、楊平郡住民の 3,398 人が参加した。2010 年から 2013 年の第三期から口腔内診査が実施されている。本研究の対象者は、2011 年の楊平郡研究に参加した 40 歳から 79 歳の住民とし、676 人が口腔内診査や唾液採取を含む健康診査を受診した。このうち、データの欠落があった者や唾液採取ができなかった者 133 人を除外し、543 人（男性 198 人、女性 345 人）を楊平郡研究の分析対象者とした。

## 2) 調査方法

### ①口腔内診査

久山町研究と楊平郡研究では、口腔の健康状態として、現在歯数、う蝕経験状態（未処置歯数、処置歯数、喪失歯数、DMF（decayed, missing, and filled）歯数、義歯の装着状況、歯周組織の健康状態を評価した。口腔内診査は、久山町研究では 9 名の歯科医師が、楊平郡研究では 2 名の歯科医師が行った。歯周組織の健康状態は、歯周ポケットの深さ（periodontal pocket depth, PD）、臨床的アタッチメントロス（clinical attachment loss, CAL）、プロービング時の出血（bleeding on probing, BOP）の有無で評価した。久山町研究では、第三回米国国民健康栄養調査に基づき歯周組織検査を実施し、第三大臼歯を除く全歯を対象に、頬側の近心と中央の PD と CAL を計測した（Shimazaki *et al.*, 2011）。楊平郡研究では、12、15、17、21、24、26、32、35、37、41、44、46 の 12 歯で、1 歯につき 6 点（頬側近心・中央・遠心、舌側近心・中央・遠心）の PD と CAL を計測した。また、BOP は 1 歯単位で計測し、BOP のあった歯数を測定歯数で除して 100 を乗じたものを BOP 割合（%BOP）とした。久山

町民と楊平郡民の歯周組織の健康状態を比較するために、上記 12 歯の頬側近心・中央の PD、CAL、BOP のデータを抽出して統計分析を行った。

## ②唾液採取

2 分間ガムを咀嚼し、その間に口腔内に貯留した唾液をサンプルチューブに吐きだしてもらい、唾液を採取した。唾液検体の採取後、氷上で保管し、その後細菌 DNA を抽出するまで $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

## 3) 唾液細菌叢の分析

### ①唾液検体からの DNA の抽出

唾液検体中に含まれる DNA の抽出は、Takeshita (2007) らの方法を一部改良して行った (Takeshita *et al.*, 2007)。500  $\mu\text{l}$  の唾液を 20,400  $g$  で遠心分離し沈殿を得た後、200  $\mu\text{l}$  の lysis buffer (1% SDS 溶液を加えた 1 mM EDTA を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 ; pH 8.0) に懸濁し、0.3  $g$  の zirconia-silica beads (直径 0.1 mm、Biospec Products、USA) と tungsten-carbide bead (直径 3 mm、Qiagen, Germany) 1 個を加えて $90^{\circ}\text{C}$ で10分間加温した後、Disruptor Genie (Scientific Industries Inc., USA) を用いて菌体を震盪、破碎し、200  $\mu\text{l}$  の 1% SDS 溶液を加えて、 $70^{\circ}\text{C}$ で10分間加温した。続いて、蛋白質成分を除去するため、フェノールによる抽出、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1、v/v) 混合溶液による抽出を行った後、エタノール沈殿処理を行い、生じた沈殿物を 50  $\mu\text{l}$  の TE 溶液 (1 mM EDTA を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 ; pH 8.0) に溶解し、分析時まで $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

## ②Tenninal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法による解析

全ての唾液検体から抽出したDNAは、迅速かつ簡便に細菌群集の全体像を把握することができるT-RFLP法を用いて解析を行った。

まず、同遺伝子においてほとんどの細菌に共通な塩基配列部位である 8F (5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3')、806R (5'-GGA CTA CCR GGG TAT CTA A-3') をプライマーとして使用し、PCR法を用いて16S rRNA遺伝子の網羅的増幅を行った。8Fおよび806Rは5'末端側にはそれぞれ蛍光色素 6-carboxyfluorescein (6-FAM)とhexachlorofluorescein (HEX) によって標識されたものを用いた。PCR反応にはKOD DNA ポリメラーゼを用いた (東洋紡績株式会社)。1 µlの鋳型DNA (100-500 ng /µl になるよう希釈したもの) に5 µlのKOD DNA ポリメラーゼ、10×PCR buffer (60 mM 硫酸アンモニウム、100 mM 塩化カルシウム、1% Triton X-100、100 µg ウシ血清アルブミンを含む1.2 M トリス塩酸緩衝液 ; pH 8.0)、5 µl の2 mM dNTPs、2 µl の25 mM 塩化マグネシウム、各0.5 µl の1 µM 両プライマー、1 µl のKOD DNAポリメラーゼ (2.5 U/µl) を加えた後、滅菌蒸留水を加えて総量を50 µl としてPCR 反応を行った。PCR 反応にはBiomtra T3 thermocycler (Biometra, Germany) を用いた。反応条件は98°C 15秒、60°C 2秒、72°C 30秒で30サイクルの反応を行った。PCR 反応終了後に、泳動用ゲル2% (wt/vol) のアガロースを含む1×TAE を用いて、アガロース電気泳動を行い、バンド出現部位を切り出したのち、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) を用いて未反応プライマー、プライマーダイマー、その他非特異的増幅断片の除去を行った。

精製した16S rRNA 遺伝子増幅断片を含む溶液3 µl は制限酵素HaeIII (認識配列はGGCC) 5 Uを用いて総量を10 µl とし37°C で3時間消化した後、キャピラリー電気泳動を行った。切断したDNA溶液 2 µl に対して、9 µl の脱イオン化ホルムアミド、1 µl のサイズスタンダードを混合し、95°Cで5分間加熱し熱変性さ

せた後、急冷してキャピラリー電気泳動を行った。電気泳動は ABI 3130 Genetic analyzer ( Applied Biosystems, USA ) を用い、60°C、15 kV の条件で30分泳動した。データの取り込みおよび解析は GeneMapper version 4.0 (Applied Biosystems, USA) を用いて行った。これにより、それぞれの細菌叢の構成を横軸に細菌種、縦軸に細菌の量を反映した波形パターンとして表した。

2,815名の波形パターンは、解析言語 R version 3.0.1 (R Development Core Team 2012) を用いて主成分分析 (Principal Component Analysis; PCA) を行い、検体間の類似度関係を第一、第二主成分を示す散布図として視覚化した。6-FAM標識およびHEX標識された5' 末端切断断片 (Terminal restriction fragments; TRF、波形パターンにおいてピークとして表れる) のうち高い因子付加量を示すものの組み合わせに該当する細菌種については Human Oral Microbiome Database (HOMD) に登録されている831種の細菌のなかから塩基配列データをもとに選択した。選択の際のキャピラリー電気泳動におけるDNA断片長の測定誤差は分子量で±600とした。

### ③バーコードパイロシーケンシング法による解析

全2,815名の被験者のなかから、以下の条件で健康な口腔を維持している者を選出し、バーコードパイロシーケンシング法を用いて細菌構成のより詳細な解析を行った。本研究で用いた「健康な口腔」の基準は以下のとおりである。①24歯以上の現在歯をもつ、②義歯を使用していない、③未処置歯をもたない、④う蝕経験歯数10歯以下、⑤深さ4 mm以上の歯周ポケットが認められない、⑥5 mm以上の臨床的アタッチメントロスが認められない、⑦プロービング時に出血の認められる部位が10%未満である。この基準により52名の韓国人と88名の日本人を選出した。

選出された140名の被験者のDNA検体はそれぞれ454 Life Sciences adapter A配列と患者ごとに異なる10塩基のバーコード配列を付加した27F (5'-CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG XXX XXX XXX XAG AGT TTG ATC MTG GCT CAG-3') と454 Life Sciences adapter B配列を5'末端側に追加した338R (5'-CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TCT CAG TGC TGC CTC CCG TAG GAG T-3') をプライマーとしてPCR法を用いて16S rRNA遺伝子V1-V2領域の網羅的増幅を行った。PCR反応にはKOD DNA ポリメラーゼを用いた (東洋紡績株式会社)。1 µlの鋳型DNA (100-500 ng/µl になるよう希釈したもの) に5 µlのKOD DNA ポリメラーゼ、10×PCR buffer (60 mM 硫酸アンモニウム、100 mM 塩化カルシウム、1% Triton X-100、100 µg ウシ血清アルブミンを含む1.2M トリス塩酸緩衝液 ; pH 8.0)、5 µl の2 mM dNTPs、2 µl の25 mM 塩化マグネシウム、各0.5 µl の1 µM 両プライマー、1 µl のKOD DNAポリメラーゼ (2.5 U/µl) を加えた後、滅菌蒸留水を加えて総量を50 µl としてPCR 反応を行った。PCR 反応にはBiomtra T3 thermocycler (Biometra, Germany) を用いた。反応条件は98°C 15秒、60°C 2秒、72°C 30秒で30 サイクルの反応を行った。PCR 反応終了後に、泳動用ゲル2% (wt/vol) のアガロースを含む1×TAE を用いて、アガロース電気泳動を行い、バンド出現部位を切り出したのち、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) を用いて未反応プライマー、プライマーダイマー、その他非特異的増幅断片の除去を行った。精製された各増幅断片は NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA) を用いてDNA濃度と純度を測定した後、各検体が等濃度になるよう混合した。混合検体は454 Life Science Genome sequencer FLX instrument (Roche, Switzerland) を用いてadaptor A配列からの塩基配列を決定した。塩基配列の決定は北海道システム・サイエンス株式会社 (札幌市) に受託して行った。

#### ④塩基配列データの解析

得られた塩基配列データはプログラミング言語 PHP によって書かれたスクリプトにより 240 塩基未満、平均クオリティスコアが 25 未満のものを除去した後、解析言語 R を用いたスクリプトにより両プライマー配列が認められないもの、適切なバーコード配列が検出されないもの、7 塩基以上のホモポリマー配列が認められるものを除去した。これらのクオリティチェックを通過した塩基配列データは各被験者固有のバーコード配列に基づき由来する被験者ごとに選別したのちバーコード配列を除去した。バーコード配列を除去した全ての塩基配列データは 16S rRNA 遺伝子解析ソフトウェアパッケージ QIIME (Caporaso *et al.*, 2010) を用いて 97%以上の塩基配列相同性の認められる配列を解析操作上同一菌種 (operational taxonomic unit: OTU) の配列とみなし、代表配列の抽出と同一配列の計数を行った。代表配列についてはソフトウェア Chimera Slayer (Haas *et al.*, 2011) を用いて PCR の際に誤って増幅されることで生じるキメラ配列の検出を行い、該当の配列がキメラ配列と推定されその被験者のみで検出されたものであった場合キメラ配列とみなし以降の解析から除去した。

キメラ配列を除去した塩基配列データを用い、まず解析言語 R を用いて各検体から検出菌種数、Phylogenetic diversity、Shannon diversity index の算出を行った。続いて各検体間の細菌構成の類似度の算出を行った。細菌群集間の類似度には検出された代表塩基配列の有無に加え配列同士の系統学的距離を考慮した指標 UniFrac (Lozupone and Knight 2005) を用い、140 検体全ての組み合わせについて菌叢類似度を算出した。本指標では細菌構成が完全に一致している場合は 0、完全に異なる場合は 1 を示す。UniFrac の算出は QIIME を用いて行った。解析言語 R を用いて主座標分析 (Principal Coordinate Analysis: PCoA) を行い、第一、第二主座標を示す散布図において各被験者間の細菌叢の類似度関係を視覚化し

た。さらにそれぞれの検体の細菌構成の詳細を明らかにするため、代表配列を RDP Classifier (Wang Q et al. 2007) を用いて菌属レベルまでの特定を行った。Confidence threshold が 60%以上であれば該当菌属とみなした。加えて両国の細菌構成の違いに関わる重要な OTU を特定するために解析言語 R を用いて partial least-squares discrimination analysis (PLS-DA) を行った。重要度を示す指標である variable importance in projection (VIP) (Perez-Enciso and Tenenhaus 2003) が 2 を超えるものを key OTU とみなした。key OTU については HOMD (Chen *et al.*, 2010) に登録されている 831 の口腔細菌の 16S rRNA 遺伝子配列に対して BLAST 解析を行い、98%以上の相同性が認められた場合該当の菌種とみなした。

#### ⑤統計学的分析

統計学的分析は全て解析言語 R version 3.0.1(R Development Core Team 2012) を用いて行った。両国の検出菌種数、Phylogenetic diversity、Shannon diversity index、各菌門および菌属の構成比率の比較は Student の t 検定を行った。UniFrac を用いた両国の細菌群集の全体構成の違いの有無については Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) を用いて検定を行った。いずれの解析においても p 値が 0.05 以下であれば有意とした。

## 4. 結果

### 1) 分析対象者の属性

分析対象者は、久山町研究で 2,272 人、楊平郡研究で 543 人であった。年齢の範囲は 40 歳から 79 歳で、平均年齢±標準偏差は、久山町民で  $59.9 \pm 10.3$  歳、楊平郡民で  $61.1 \pm 8.9$  歳であった (図 1)。

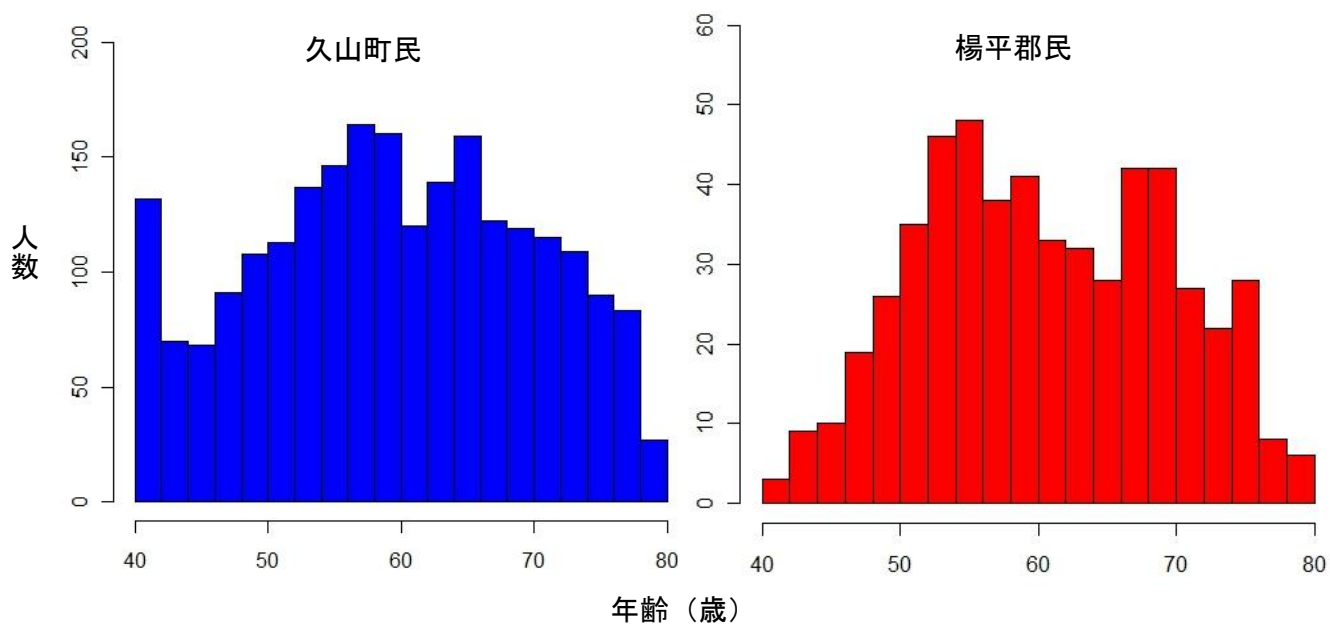


図 1. 年齢分布

## 2) 口腔の健康状態の比較

口腔の健康状態として、現在歯数、義歯の装着状況、う蝕経験状態（未処置歯数、DMF 歯数）、歯周組織の健康状態を評価し、久山町民と楊平郡民の口腔の健康状態を比較した。

現在歯数の平均は、久山町民で  $22.6 \pm 7.5$  歯、楊平郡民で  $24.4 \pm 6.2$  歯であった（図 2）。24 歯以上保有している者は、久山町民で 1,405 人（61.8%）、楊平郡民で 378 人（69.6%）であった。また、無歯顎者は、久山町民で 61 人（2.7%）、楊平郡民で 2 人（0.2%）と、楊平郡民に比べ久山町民のほうが、無歯顎者が多かった。

義歯の装着状況では、久山町民は全体で 27.6%、楊平郡民は 16.8%が義歯を装着していた。年齢別にみると、70 歳から 79 歳の者において、久山町民の 59.1%、楊平郡民の 36.8%が義歯を装着していた。

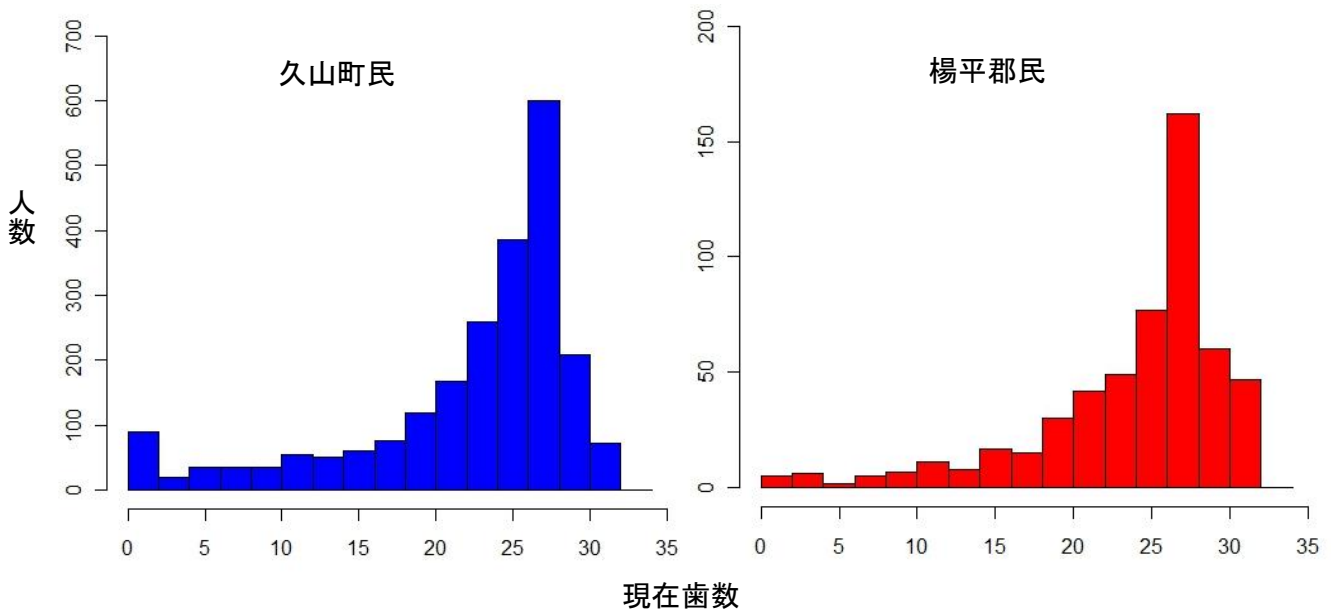


図 2. 久山町民と楊平郡民における現在歯数の分布

う蝕有病状況では、未処置歯を保有している者の割合は、久山町民で 29.7% であったのに対し、楊平郡民では 57.3% であった。久山町民に比較し、楊平郡民は未処置歯を保有している者が多かった（図 3）。

DMF 歯数において、久山町民は  $19.3 \pm 6.6$  歯、楊平郡民は  $10.3 \pm 7.2$  歯で、久山町民のほうが DMF 歯数は多かった（図 4）。

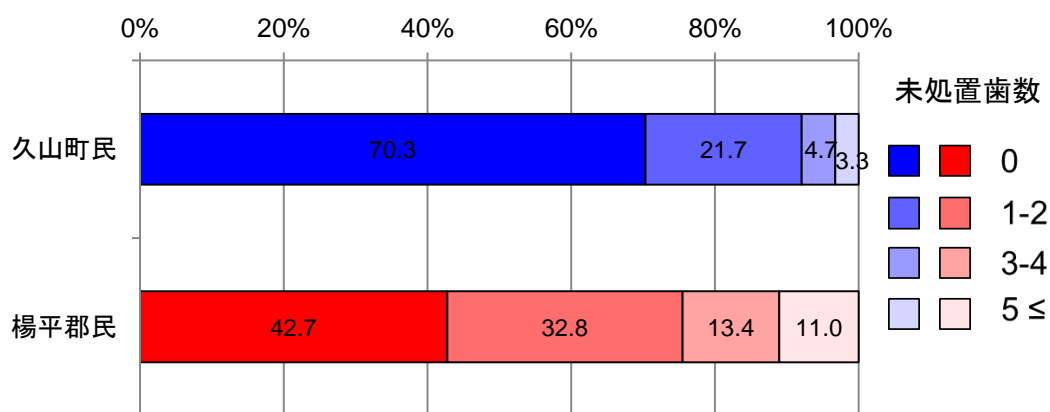


図 3. 久山町民と楊平郡民における未処置歯保有者の割合

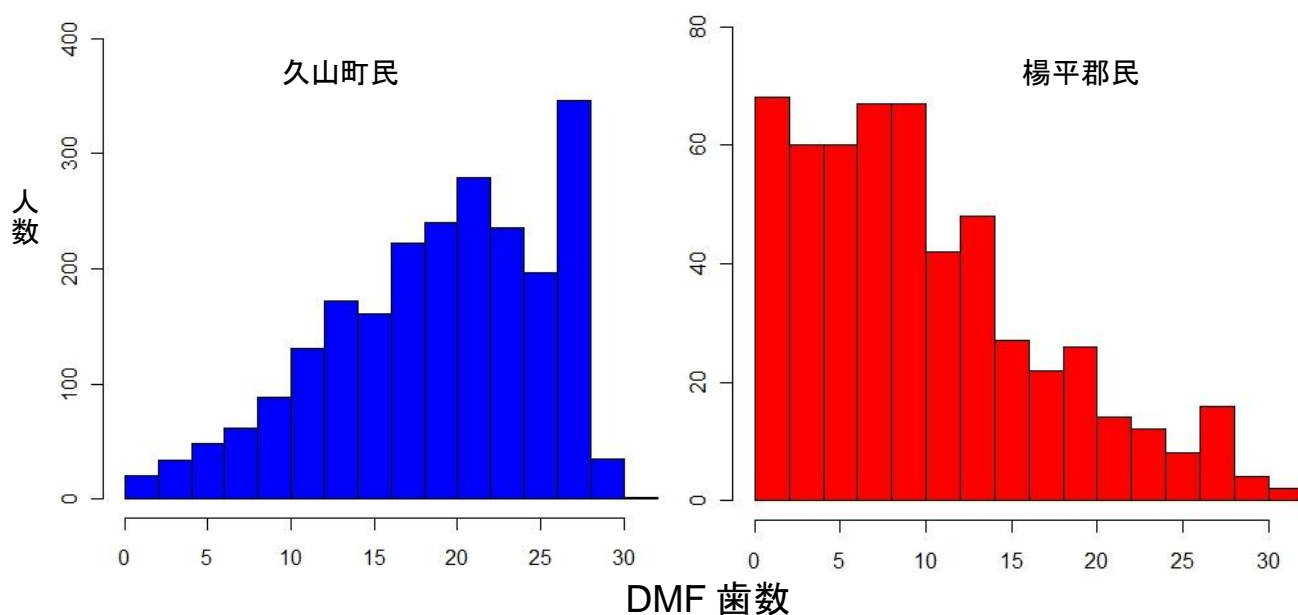


図 4. 久山町民と楊平郡民における DMF 歯数の分布

歯周組織の健康状態では、検査対象歯がない者を除外し、久山住民 2,192 人、楊平郡民 537 人を評価した。PD 4 mm 以上の歯を少なくとも 1 歯以上有する者は、久山住民は 851 人 (38.8%)、楊平郡民は 91 人 (18.0%) であった (図 5)。また、CAL 5 mm 以上の歯を少なくとも 1 歯以上有する者は、久山住民は 751 人 (34.3%)、楊平郡民は 138 人 (25.4%) であった (図 6)。%BOP では久山住民と楊平郡民では大きな違いはなかったが (図 7)、PD および CAL の状況より、楊平郡民よりも久山住民のほうが、歯周組織の健康状態が不良であったことが伺える。

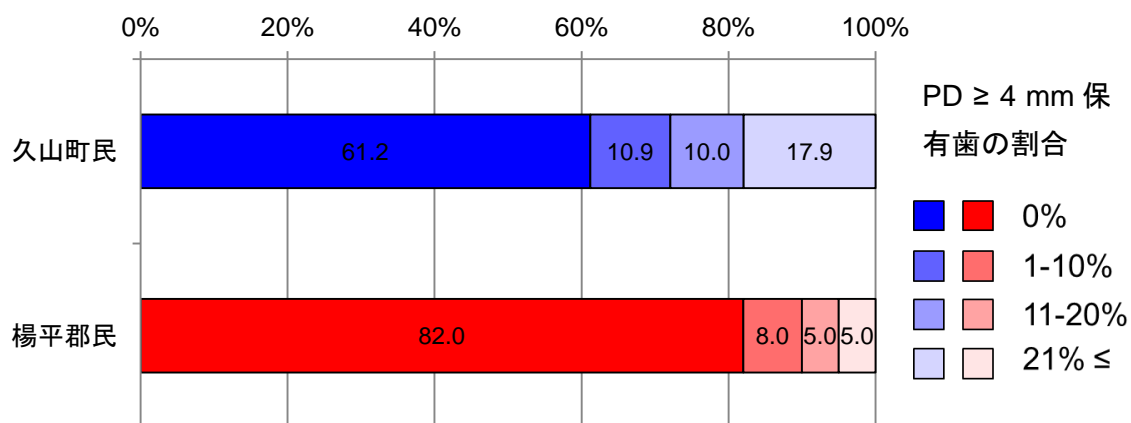


図 5. 久山町民と楊平郡民における PD ≥ 4 mm 保有者

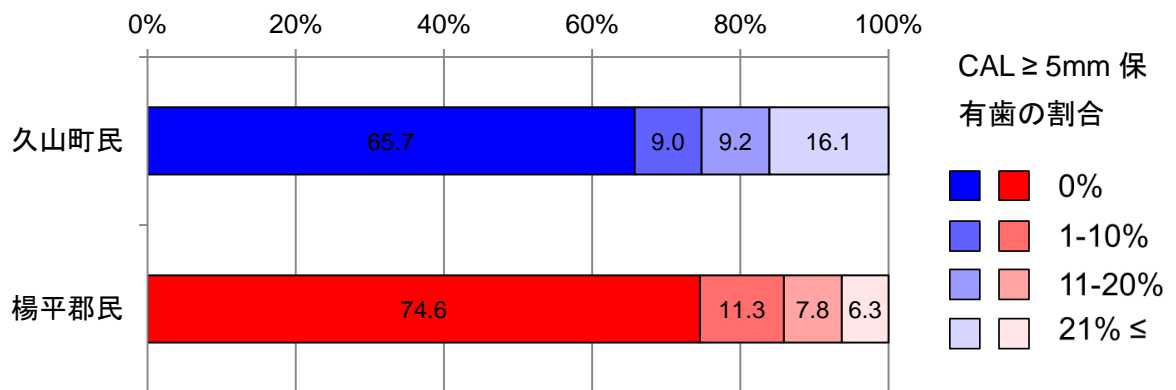


図 6. 久山町民と楊平郡民における CAL ≥ 5 mm 保有者

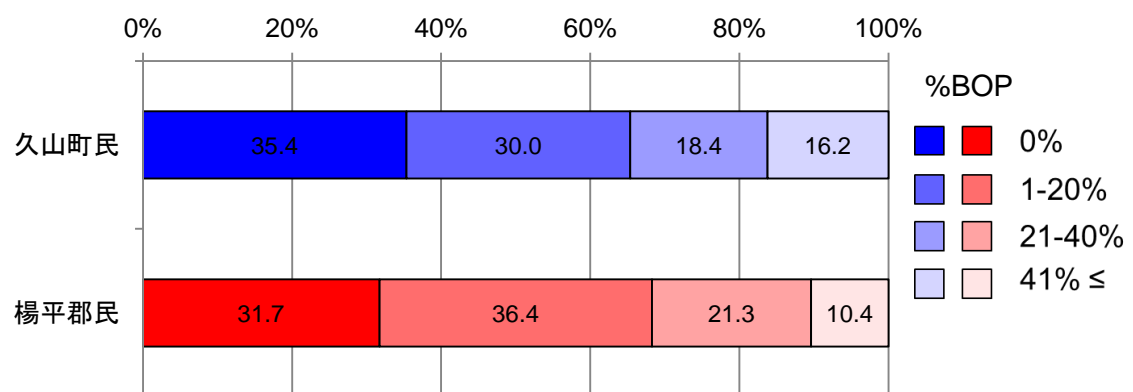


図 7. 久山町民と楊平郡民における %BOP

口腔の健康状態の評価指標における量的データと質的データの分析結果を表 1 に示す。楊平郡民に比べ、久山町民は、未処置歯数は少ないが DMF 歯数は多く、歯周健康状態が不良な傾向であった。

表 1. 久山町民と楊平郡民における口腔の健康状態 [n (%)]

	久山町民 (n = 2,272)	楊平郡民 (n = 543)
年齢*	59.9 ± 10.3	61.1 ± 8.9
男性	1011 (44.5)	198 (36.5)
現在歯数*	22.6 ± 7.5	24.4 ± 6.2
≥ 24 歯	1405 (61.8)	378 (69.6)
< 24 歯	867 (38.2)	165 (30.4)
義歯の装着あり	626 (27.6)	91 (16.8)
DMF 歯数*	19.3 ± 6.6	10.3 ± 7.2
≤ 10 歯	252 (11.1)	322 (59.3)
> 10 歯	2020 (88.9)	221 (40.7)
未処置歯数*	0.7 ± 1.6	1.7 ± 2.2
0 歯	1598 (70.3)	232 (42.7)
≥ 1 歯	674 (29.7)	311 (57.3)
PD ≥ 4 mm 保有歯数**	10.7 ± 19.4	3.6 ± 10.8
0 歯	1341 (61.2)	440 (81.9)
≥ 1 歯	851 (38.8)	97 (18.1)
CAL ≥ 5 mm 保有歯数**	9.7 ± 18.9	4.7 ± 11.5
0 歯	1441 (65.7)	399 (74.3)
≥ 1 歯	751 (34.3)	138 (25.7)
%BOP**	19.8 ± 23.3	17.2 ± 19.3
≤ 20	1433 (65.4)	369 (68.0)
> 20	759 (34.6)	168 (31.3)

\* 平均値 ± 標準偏差

† 検査対象歯がない者を除外; 久山市民 (n = 2,192), 楊平郡民 (n = 537)

### 3) T-RFLP 法を用いた両集団の唾液中細菌構成の比較

両集団の全被験者2815名の唾液中の細菌構成は、簡便にその全体像をピークパターンとして表すことができる16S rRNA 遺伝子T-RFLP法を用いて解析を行った。T-RFLPピークパターンの両集団での差異の有無を視覚化するために主成分分析を行い、全検体の類似度関係を第一、第二主成分を両軸とした散布図として示した (図8)。PCAプロットにおいて韓国人被験者は日本人被験者に比べ第一主成分の負の方向に局在しており、この両群のピークパターンの違いは統計的に有意であった (PERMANOVA,  $P < 0.001$ )。図9では同図に第一主成分方向に高い因子付加量を示す、すなわち両群の差異に強く関わるTRF (ピーク) を加えて示した。11のTRF (F23、F34、F52、F54、F64、F90、F92、R14、R30、R34、R41) が第一主成分の負の方向に高い ( $< -0.4$ ) 因子付加量を示し、これらのTRFの断片長と6-FAM標識TRFとHEX標識TRFの組み合わせから*Neisseria*、*Haemophilus*、*Porphyromonas*などがこれらのTRFに該当する菌種であることが推定された (表2)。一方で正の方向には10のTRF (F23、F34、F52、F54、F64、F90、F92、R14、R30、R34、R41) が高い因子付加量を示し、これらのTRFは*Prevotella*属、*Veillonella*属であることが推定された (表2)。これらの結果から、韓国人被験者に比べ日本人被験者の唾液中には*Prevotella*属、*Veillonella*属の菌種がより優勢であり、*Neisseria*、*Haemophilus*、*Porphyromonas* といった細菌の構成比率が低いことが示唆された。

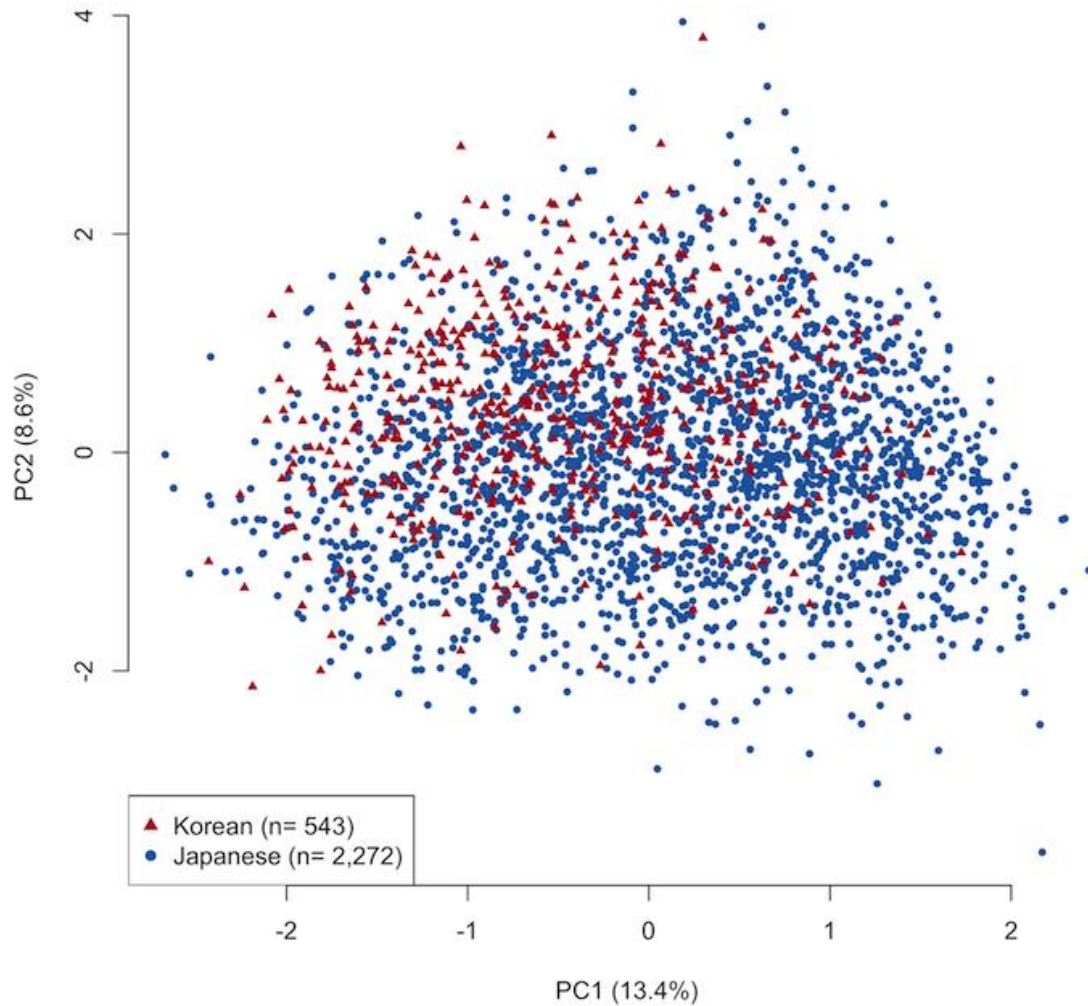


図8 全被験者2,815名のT-RFLPピークパターンの類似度関係。主成分分析を行い、第一、第二主成分を両軸とした散布図として示した。両主成分によって全分散の22.0%を表している。

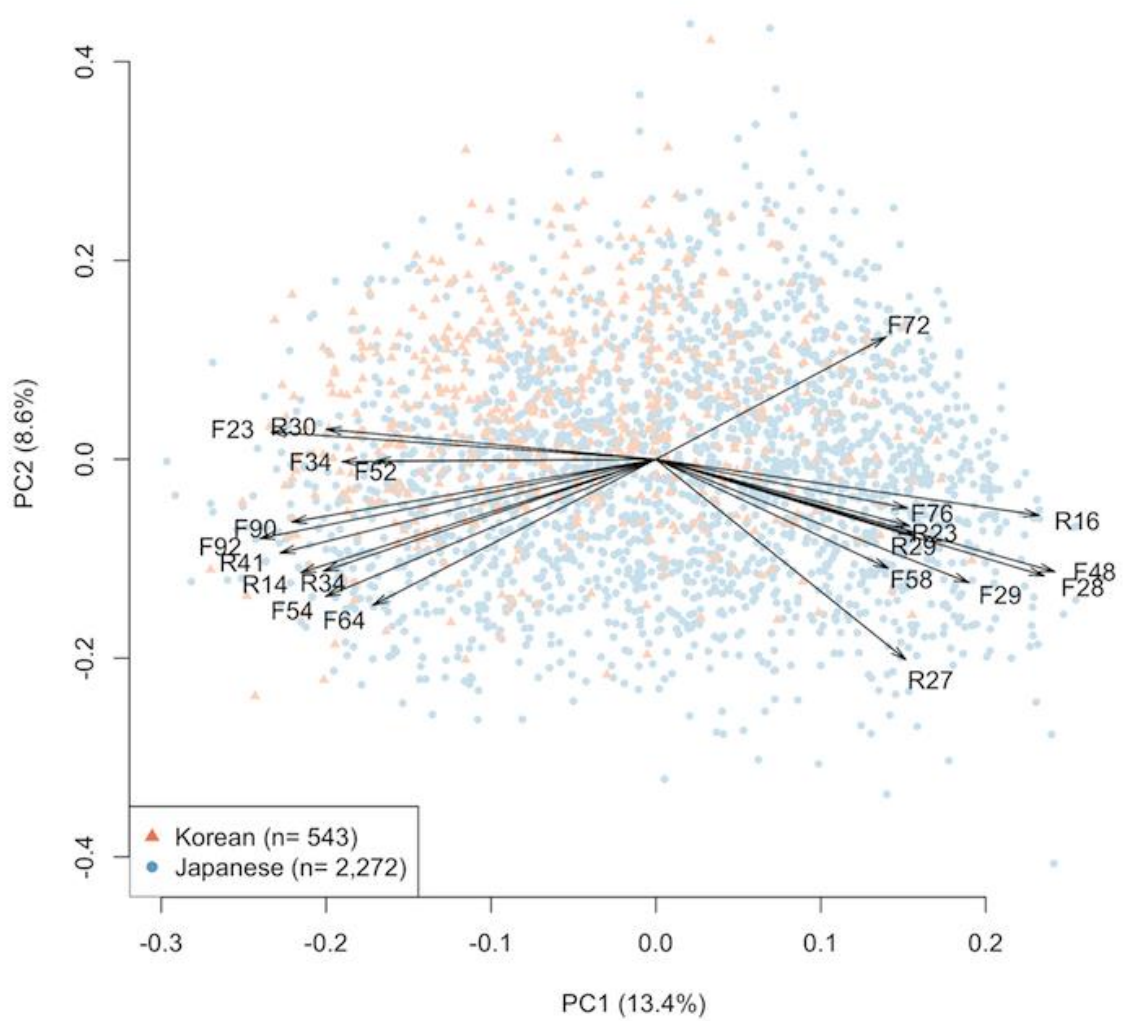


図9 図8の主成分分析プロットに第一主成分方向に高い (絶対値で0.4以上) 因子付加量を示す TRF を矢印として加えて示した。矢印の長さは因子付加量の大きさを示す。

表 2 TRF の組み合わせに該当する菌種

TRF の組み合わせ	該当する菌属	該当する菌種 (Oral Taxon ID)
第一主成分の負の方向に高い因子付加量を示す TRF		
F23-R30	<i>Neisseria</i>	<i>N. oralis</i> (14), <i>N. weaveri</i> (92), <i>N. subflava</i> (476), <i>N. elongata</i> (598), <i>N. flava</i> (609), <i>N. flavescens</i> (610), <i>N. lactamica</i> (649), <i>N. meningitidis</i> (669), <i>N. mucosa</i> (682), <i>N. pharyngis</i> (729), <i>N. sicca</i> (764) and 2 oral taxon (15, 16)
	<i>Haemophilus</i>	<i>H. aegyptius</i> (535), <i>H. ducreyi</i> (821), <i>H. influenzae</i> (641), <i>H. parainfluenzae</i> (718), <i>H. haemolyticus</i> (851) and 2 oral taxon (35, 36, 908)
	<i>Aggregatibacter</i>	<i>A. actinomycetemcominans</i> (531), <i>A. aphrophilus</i> (545), <i>A. paraphrophilus</i> (720), <i>A. segnis</i> (762) and 3 oral taxon (458, 512, 513, 898)
	<i>Eikenella</i>	1 oral taxon (11)
	<i>Ralstonia</i>	<i>R. pickettii</i> (854) and 1 oral taxon (406)
F34-R30	<i>Neisseria</i>	<i>N. bacilliformis</i> (13), <i>N. polysaccharea</i> (737) and one oral taxon (20)
	<i>Eikenella</i>	<i>E. corrodens</i> (577)
	<i>Kingella</i>	<i>K. oralis</i> (706)
	<i>Simonsiella</i>	<i>S. muelleri</i> (683)
F54-R34	<i>Fusobacterium</i>	<i>F. periodonticum</i> (201)
F64-R30	<i>Treponema</i>	2 oral taxon (251, 256)
F90-R14	<i>Porphyromonas</i>	<i>P. catoniae</i> (283) and 4 oral taxon (275, 277, 279, 284)
F92-R41	<i>Porphyromonas</i>	<i>P. gingivalis</i> (619) and 1 oral taxon (395)
第一主成分の正の方向に高い因子付加量を示す TRF		
F28-R16	<i>Veillonella</i>	<i>V. dispar</i> (160), <i>V. parvula</i> (161) and <i>V. denticariosi</i> (887)
F29-R16	<i>Dialister</i>	<i>D. microaerophilus</i> (843)
	<i>Anaeroglobus</i>	<i>A. geminatus</i> (121)
F48-R27	<i>Prevotella</i>	<i>P. histicola</i> (298) and <i>P. melaninogenica</i> (469)
	<i>Alloprevotella</i>	<i>A. rava</i> (302), <i>A. tannera</i> (466) and 6 oral taxon (308, 473, 474, 912, 913, 914)

TRF に該当する菌種は Human Oral Microbiome Database に登録されている 831 菌種から選んだ。

#### 4) バーコードパイロシーケンシング法による解析

前述の全被験者に対する T-RFLP 法を用いた分析において両国の被験者の細菌構成に注目すべき差異が認められた一方で、この違いは単に表 1 で示した両集団の口腔の健康状態の違いを反映しているだけである可能性が残る。そこで我々は両集団から口腔の健康を維持している被験者を選出し、口腔状態の口腔細菌構成に与える影響を排除した地域差の解明を目指した。2,815 名の被験者のうち、52 名の韓国人被験者 (女性 39 名、男性 13 名、 $54 \pm 6$  歳) と 88 名の日本人被験者 (女性 41 名、男性 47 名、 $54 \pm 6$  歳) が「対象および方法」に示した条件に基づき選出された。これらの被験者は図 8 で示した主成分分析プロットにおいては第一主成分の負の方向に局在しており (図 10)、全被験者のなかでは唾液中に *Neisseria*、*Haemophilus*、*Porphyromonas* の菌種がより優勢で、*Prevotella* 属、*Veillonella* 属といった細菌の構成比率が小さな被験者であることが示唆された。

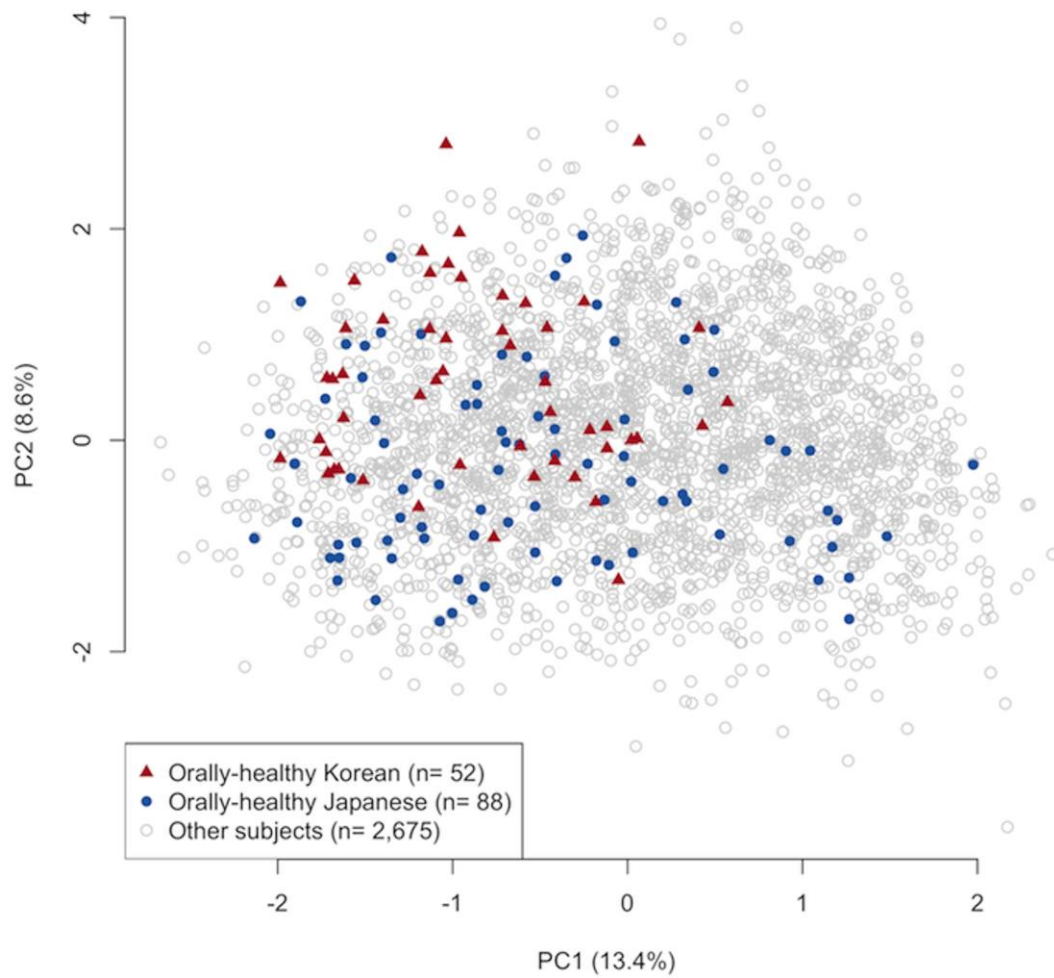


図 10 図 8 においてバーコードパイロシーケンシング法を用いて解析を行った口腔の健康な被験者 140 名を異なる色のプロットで示した。

140名の被験者の唾液中の細菌構成は T-RFLP 法に比べより詳細な情報を得ることができるバーコードパイロシーケンス法を用いて解析を行った。140名の被験者の 16S rRNA 遺伝子 V1—V2 領域増幅断片混合検体に対し、次世代シーケンサー Roche 454 Genome sequencer により 850,867 リードの DNA 断片の塩基配列が解読され、そのうち 419,397 リード (平均リード長、333 ± 7 塩基) がクオリティチェックを通過した。これらの塩基配列は 97% 以上の類似性を示す配列を同一菌種由来 (OTU) とみなすと、2,703 に分類された。140 検体全ての組み合わせについて細菌群集構成類似度指標 UniFrac を算出し、検体同士の類似度関係を視覚化するために主座標分析 (Principal coordinate analysis、PCoA) を用いて第一、第二主座標を軸とした散布図において示すと、日本人および韓国人被験者が明らかに偏って存在することが示された (図 11)。この違いは統計的にも有意であった (PERMANOVA、 $P < 0.001$ )。

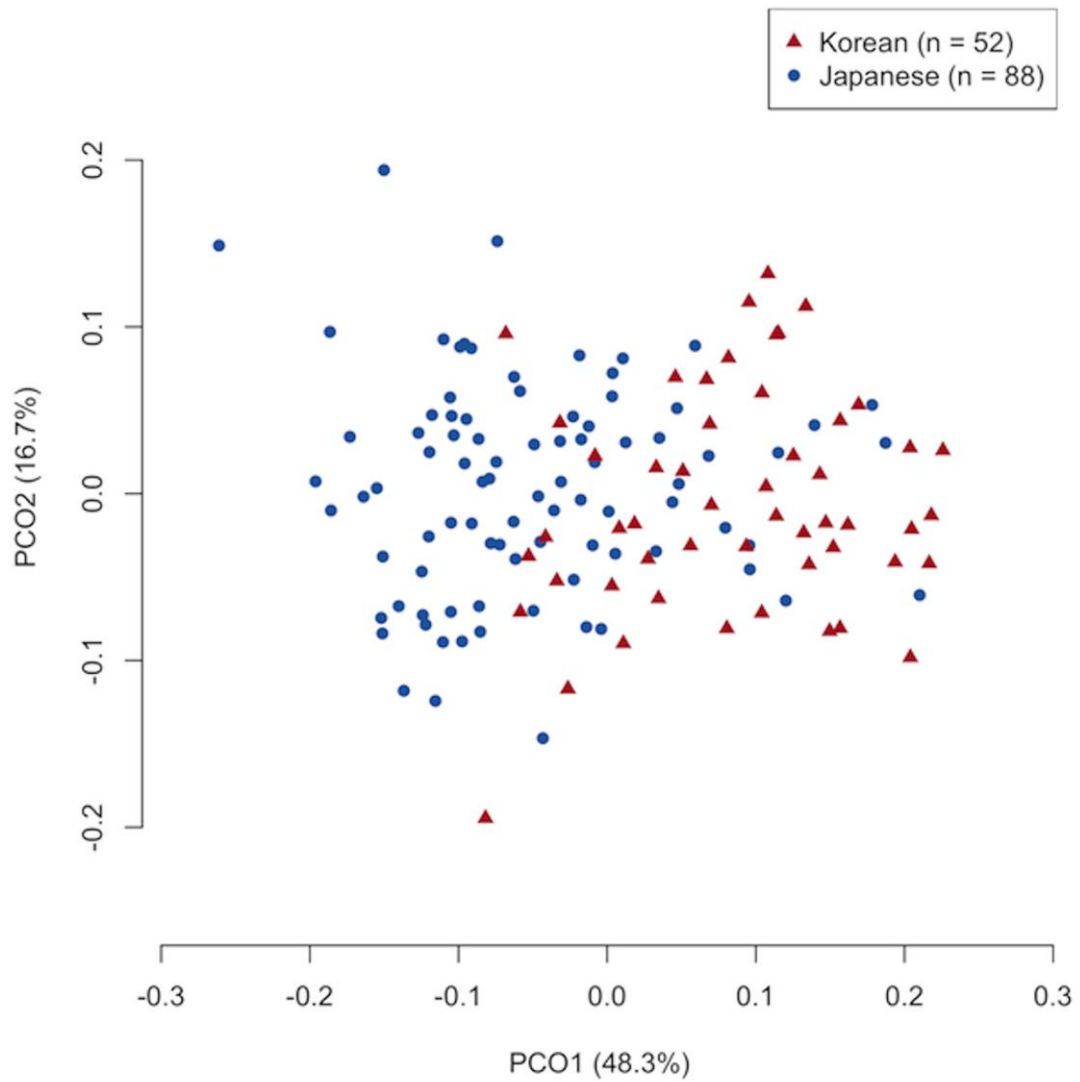


図 11 口腔の健康な被験者 140 名の細菌構成の類似度関係。140 名全ての組み合わせについて細菌群集類似度 weighted UniFrac を算出し、主座標分析を行い、第一、第二主座標を両軸とした散布図として示した。両主座標によって全分散の 65.0%を表している。

細菌叢の複雑さを示す  $\alpha$ -diversity に関わる三つの指標（検出菌種数、Phylogenetic diversity（検出される菌種の系統的幅の広さ）、Shannon diversity index（検出される菌種数と均等度を考慮した指標））はいずれも日本人被験者でより高く、いずれも統計的に有意であった。日本人被験者の唾液中の細菌構成は韓国人に比べより複雑であることが示唆される。

表 3 両国被験者の唾液中の細菌群集の  $\alpha$ -diversity の比較

	久山町 (n = 88)	楊平郡 (n = 52)	<i>P</i> value
検出菌種数	127 ± 21	104 ± 19	< 0.001
Phylogenetic diversity	10.9 ± 1.5	9.5 ± 1.3	< 0.001
Shannon diversity index	3.6 ± 0.3	3.1 ± 0.3	< 0.001

各検体の解読リード数の違いを補正するために、それぞれの被験者由来の塩基配列から 1000 リードをランダムに選び、それによって  $\alpha$ -diversity を算出した。有意差の検定には Student の t 検定を用いた。

菌門レベルではこれまでの他の研究同様、*Firmicutes*、*Proteobacteria*、*Bacteroidetes*、*Actinobacteria*、*Fusobacteria* の 5 菌門が細菌構成の大半を占めていた。これら 5 菌門以外では TM7、*Spirochaetes*、SR1、*Tenericutes*、*Cyanbacteria*、*Planctomycetes* といった菌門も検出されたがその構成比率は極めて小さかった。*Fimicutes*、*Proteobacteria*、*Bacteroidetes*、*Fusobacteria*、TM7 の構成比率については両集団間で有意な差が認められた (図 12)。

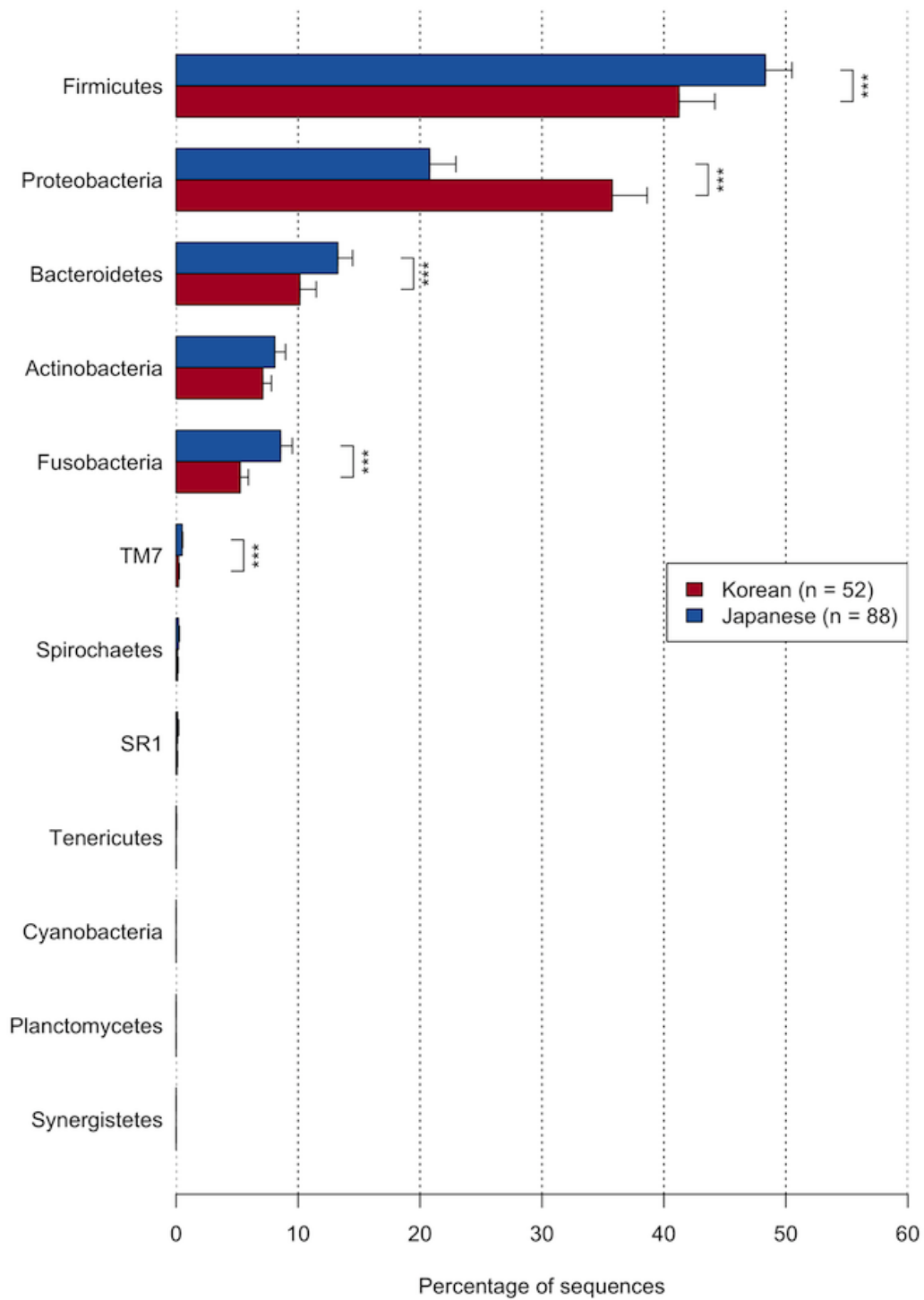


図 12 口腔の健康な被験者の唾液細菌叢から検出された各細菌門の構成比率 (平均値 ± 95%信頼区間)。有意差の検定には Student の t 検定を用いた。\*\*\* $P < 0.001$ 。

菌属レベルでは 97 の菌属が検出され、そのうちの 73 菌属はどちらの国の被験者からも検出された。10 菌属 (*Streptococcus*、*Neisseria*、*Veillonella*、*Prevotella*、*Fusobacterium*、*Haemophilus*、*Actinomyces*、*Gemella*、*Porphyromonas*、*Granulicatella*) は 140 名全員から検出され、細菌群集全体の  $86.0 \pm 5.0\%$  を占めていた。一方でそれらを含めた各菌属の構成比率は両国で大きく異なっていた。*Neisseria* をはじめとする 3 菌属の構成比率は、日本人に比べ韓国人において有意に高かった。一方、*Veillonella*、*Fusobacterium*、*Prevotella*、*Gemella*、*Granulicatella* を含む 19 菌属は日本人でより優勢であった (表 4)。

表 4 日本人被験者と韓国人被験者で有意に異なる 22 菌門の構成比率

	久山町 (n = 88)	楊平郡 (n = 52)	P value
韓国人被験者でより優勢な菌属			
<i>Neisseria</i>	12.27 ± 8.13	26.53 ± 9.90	< 0.001
<i>Actinobacillus</i>	0.29 ± 0.39	0.63 ± 0.75	0.003
<i>Bergeriella</i>	0.01 ± 0.03	0.04 ± 0.10	0.030
日本人被験者でより優勢な菌属			
<i>Veillonella</i>	6.48 ± 3.06	3.55 ± 1.97	< 0.001
<i>Fusobacterium</i>	6.20 ± 3.92	3.96 ± 1.91	< 0.001
<i>Prevotella</i>	6.20 ± 4.82	2.90 ± 1.89	< 0.001
<i>Gemella</i>	4.75 ± 2.37	2.41 ± 1.18	< 0.001
<i>Granulicatella</i>	4.46 ± 1.93	3.41 ± 1.46	< 0.001
<i>Schlegelella</i>	1.10 ± 1.31	0.45 ± 0.56	< 0.001
<i>Solobacterium</i>	0.73 ± 0.53	0.50 ± 0.44	0.006
<i>Parvimonas</i>	0.59 ± 0.68	0.07 ± 0.11	< 0.001
TM7 genera incertae sedis	0.49 ± 0.40	0.20 ± 0.17	< 0.001
<i>Abiotrophia</i>	0.36 ± 0.54	0.07 ± 0.18	< 0.001
<i>Campylobacter</i>	0.35 ± 0.24	0.23 ± 0.21	0.004
<i>Oribacterium</i>	0.33 ± 0.25	0.23 ± 0.19	0.007
<i>Aggregatibacter</i>	0.33 ± 0.42	0.16 ± 0.15	0.001
<i>Tannerella</i>	0.11 ± 0.13	0.04 ± 0.05	< 0.001
<i>Selenomonas</i>	0.10 ± 0.10	0.06 ± 0.06	0.002
<i>Tessaracoccus</i>	0.07 ± 0.09	0.03 ± 0.06	0.001
<i>Catonella</i>	0.06 ± 0.07	0.03 ± 0.04	0.004
<i>Sebaldella</i>	0.04 ± 0.07	0.02 ± 0.03	0.027
<i>Mycoplasma</i>	0.02 ± 0.05	0.01 ± 0.02	0.013

有意差の検定には Student の t 検定を用いた。

さらに両国の被験者の細菌構成の違いを決定づけている菌種を推定するために、2,703OTU の各被験者における構成比率のデータを用いて PLS-DA を行った。これにより重要度を示す指標である VIP スコアが 2 を超える 13 の OTU が検出され、これらの各検体における構成比率をヒートマップで示したのが図 13 である。これらの OTU に該当する菌種を前述の口腔細菌データベース HOMD から検索したところ、韓国人被験者で特徴的に検出される OTU が *Neisseria flavascens* に相当し、一方日本人被験者において特徴的に検出される OTU が *Veillonella rogosae*、*Fusobacterium nucleatum*、*Prevotella melaninogenica*、*Gemella sanguinis* などに相当するものであることが明らかとなった。

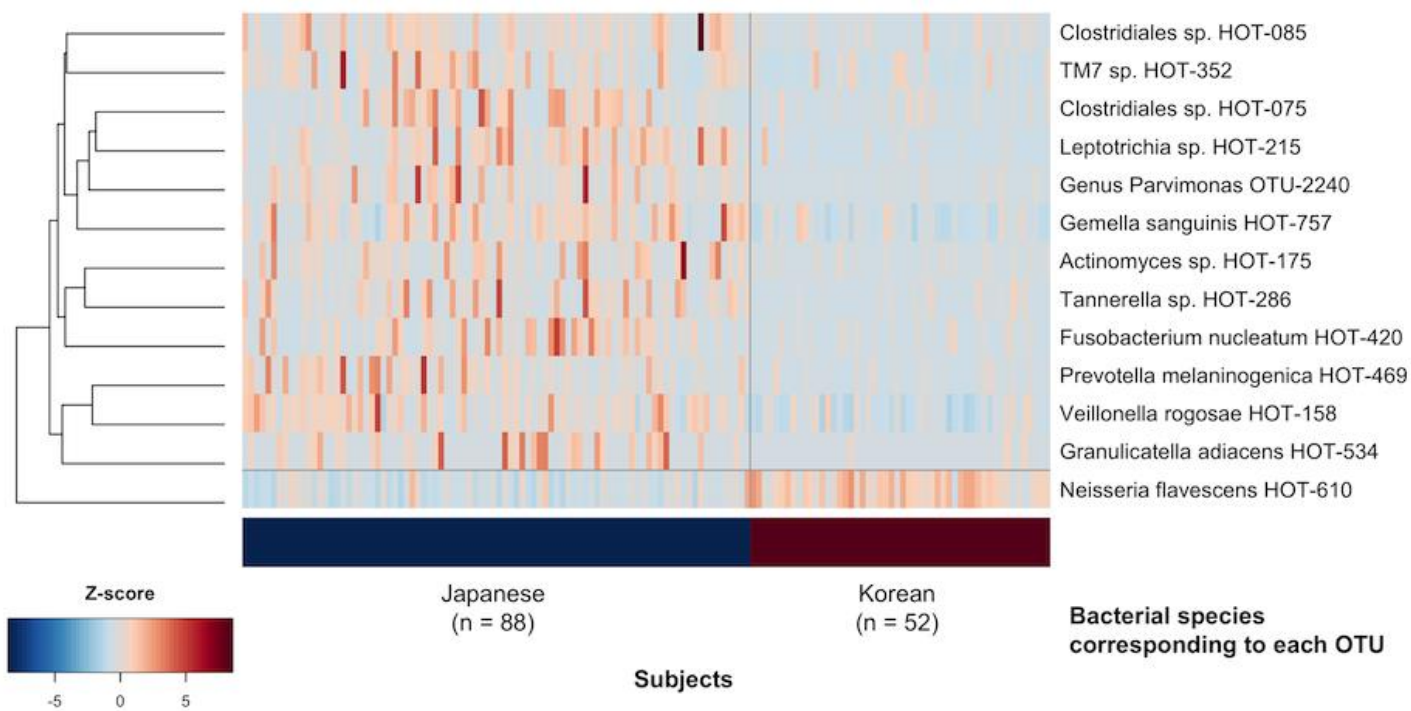


図 13 PLS-DA によって特定された日本人被験者と韓国人被験者の細菌構成の違いを決定づける OTU の構成比率。VIP スコアが 2 を超える 13OTU のみ示した。各 OTU の構成比率は 140 名で平均 0、分散 1 になるよう標準化 (z スコア化) し、各マスの色の強さ (青、低比率、赤、高比率) となるように示した。13OTU はクラスター解析の結果に基づいて並べ替え、樹状図を左に示した。

## 5. 考察

唾液細菌叢構成の地域差の存在については Nasidze らによって行われたウガンダに住むピグミー族とシエラレオネおよびコンゴ共和国に住む農耕民との唾液細菌叢の比較において既に報告がある (Nasidze *et al.*, 2011)。このなかで彼らはピグミー族の唾液細菌叢の構成が農耕民たちに比べより複雑であることを明らかにし、彼らの狩猟採集という生活様式および食生活が細菌構成に影響を与えたのではないかと指摘している。本研究においても口腔の健康な成人の唾液中の細菌構成に韓国の楊平郡と日本の久山町とのあいだで明らかな地域差が認められたが、韓国人と日本人は遺伝的に近縁であるうえ (Hugo Pan-Asian SNP Consortium *et al.*, 2009)、唾液細菌叢に対する遺伝的影響は環境要因に比べ小さいことが双生児を用いた研究で既に指摘されている (Stahringer *et al.*, 2012)。さらに本研究に参加した日本人被験者と韓国人被験者はともに福岡市とソウル市という東アジアの大都市近郊のベッドタウンで生活しており、生活習慣や食生活のみならず衛生状態や社会経済状況もおそらく前述のアフリカ人同士の場合ほど大きく異なっていないと考えられる。こうしたことを踏まえると日本人と韓国人の唾液細菌構成が異なるという本研究の結果は意外であるとも言える。一方、日本と韓国とでは食生活や生活環境にいくつか注目すべき違いも認められる。例えば韓国人は一般的に日本人に比べ辛いもしくは塩辛い味付けを好み (Lee *et al.*, 2001)、韓国人の多くはほぼ毎日乳酸菌発酵食品であるキムチを食する (Lee *et al.*, 2011)。辛いもしくは塩辛い食品および発酵食品の継続的摂取は口腔細菌に何らかの影響を与える可能性が考えられる。本研究では細菌構成の違いを生む決定要因を特定することは不可能であるが、環境要因のうち両国で異なるものの中に唾液中の細菌構成に影響を及ぼすものが存在する可能性を示唆して

いる。

前述のアフリカの農耕民とピグミー族を比較した場合 (Nasidze *et al.*, 2011) とは異なり、両国の被験者の唾液から検出される菌属の有無には明らかな違いは認められなかった。一方で韓国人被験者は日本人被験者に比べ明らかにシンプルな細菌構成を呈しており (表 3)、*Neisseria* をはじめとする 3 菌属が有意に高比率存在していた (表 4)。逆に日本人被験者では *Veillonella*、*Fusobacterium*、*Prevotella* を含む 19 の菌属が韓国人に比べ優勢であった。我々は以前の T-RFLP 法とクローンライブラリー法を用いて行った研究において、歯周炎の被験者では歯周組織の健康な被験者に比べ *Veillonella*、*Prevotella* といった菌がより優勢であり、*Neisseria*、*Haemophilus*、*Porphyromonas* の比率が小さいことを報告している (Takeshita *et al.*, 2009)。本研究の全被験者に対する T-RFLP 解析の結果においても口腔の健康な被験者では、*Neisseria*、*Haemophilus*、*Porphyromonas* といった菌がより優勢であり、*Veillonella*、*Prevotella* の比率が小さいことが示唆された (図 9、表 2)。これらの結果から、韓国人被験者の細菌構成は日本人被験者に比べ「より健康な」パターンであるとみなすことができる。興味深いのはこの細菌構成の差異が口腔に全く問題のみられない被験者同士の比較においても認められたということである。すなわち、歯周組織の健康状態の悪化が細菌構成の差異を生んでいるとは考えにくい。唾液細菌叢の全体構成の安定性は 10 年の経時的変化を観察した最近の報告 (Stahringer *et al.*, 2012) や歯周治療を行いながら 2 年間観察したわれわれの報告 (Yamanaka *et al.*, 2012) において明確に指摘されている。これらの結果を鑑みると、日本人の口腔常在細菌叢は韓国人に比べより歯周炎を引き起こしやすい構成を呈しており、それが日本人の歯周炎有病率の高さを反映していると可能性が高い。

唾液中の細菌叢は単一の細菌群集ではなく、歯面、歯肉溝、舌表面、頬粘膜

といった口腔内に存在するさまざまなニッチから剥がれ落ちた細菌の混合物である。しかしながら過去の多くの研究で唾液中の細菌構成は舌苔の細菌構成に類似しており、デンタルプラークとは明らかに異なることが指摘されている (Mager *et al.*, 2003, Segata *et al.*, 2012, Zaura *et al.*, 2009)。加えて我々は唾液中の細菌叢の全体構成が歯肉縁上プラークの変化の影響をほとんど受けないことも報告している (Yamanaka *et al.*, 2012)。これらのことから唾液中の細菌構成は、おそらく歯面ではなく口腔粘膜表面の細菌叢を強く反映したものであるとみなすことができる。腸管においては常在細菌叢のバランスの変化、いわゆる *dysbiosis* が粘膜の炎症を増悪することが指摘され (Elinav *et al.*, 2011, Garrett *et al.*, 2010)、注目を集めている。特に Elinav らは腸管に炎症を引き起こしたマウスにおいて *Prevotellaceae* 科および TM7 属の菌種の増加を伴う *dysbiosis* が起こっており、さらにその腸管細菌叢を移植することで別の健全なマウスでも炎症を引き起こすことができることを明らかにしている (Elinav *et al.*, 2011)。本研究で日本人被験者に認められた *Prevotella*、*Veillonella*、TM7 などの増加を伴う口腔細菌叢の持続的な *dysbiosis* も歯肉粘膜の炎症反応を活性化しているのかもしれない。実際、Said らは炎症性腸疾患の患者の唾液中では健康な被験者に比べ、*Streptococcus*、*Neisseria*、*Haemophilus*、*Gemella* の構成比率が低く、*Prevotella*、*Veillonella* が優勢であること、さらに様々な炎症性サイトカインと IgA がより高いレベルで検出されることを報告している (Said *et al.*, 2013)。今後動物モデルを使った研究などを行っていくことで、歯肉炎や歯周炎の発症における口腔粘膜細菌叢の役割を明らかにしていくことが出来るのではないかと考えられる。

本研究ではPLS-DA分析を行うことで両国の唾液中の細菌構成の差異を決定づける12のOTUを特定した (図13)。一方で、これらは*P. gingivalis*、*T. denticola*、*T. forsythensis* といった歯周炎の病原性細菌としてよく知られた菌種には該当し

なかった。このことはバーコードパイロシーケンス法の対象となった両国の被験者が歯周炎が認められないものであることを考えれば理にかなった結果であると言える。一方で、*Fusobacterium nucleatum* が日本人の唾液中から高いレベルで検出されたというのは非常に興味深い。この菌種はデンタルプラークの形成において、*Streptococcus* などの初期付着菌と前述の歯周病原性細菌を含む後期付着菌のいずれとも共凝集することでデンタルプラークの細菌構成の複雑化を促進する「橋」のような役割をしていると考えられている (Kolenbrander *et al.*, 2010)。韓国人被験者においては*F. nucleatum* が少ないことでプラークの病原性の増加が妨げられることが、彼らの歯周炎に罹りにくさにつながっているのかもしれない。加えて*Neisseria flavescens* については口腔の健康を示すマーカーとして、さらにプロバイオティクスへ応用について今後調べていく価値があると考えられる。

今回両国の口腔診査結果を比較した際、日本人被験者の歯周炎罹患率の高さに加え、う蝕経験歯数の多いことも明らかになった (表1)。しかしながら、う蝕経験歯数は国民のもつ本来のう蝕感受性の高さに加え、その国の歯科医療システムにも依存する。というのは日本には優れた健康保険制度が存在し国民は気軽に歯科治療をうけることが可能である。実際、韓国人被験者では未処置う蝕の数が日本人被験者に比べ明らかに多い。疫学調査においては診査者ごとの診査誤差を減らすために明らかなるう蝕の認められるもののみをう蝕と定義するのに対し、歯科診療所においてはう蝕の取り残しを防ぐためにより厳しくう蝕を評価し治療を行う。日本では診療機関における厳密な診断に基づく迅速な治療が、結果としてう蝕経験歯数の増加を招いているのかもしれない。日本人のう蝕経験歯数が韓国人に比べあまりにも高いことを考えると、これを日本人のう蝕感受性の高さに関連づけるには十分な注意を要すると考えられる。

久山町が日本における人口統計学的な代表性をもつ地域であることは一般的に認知されており (Hata *et al.*, 2013)、両国の歯周組織の健康状態の違いは国家統計の比較においても明らかである。一方で、楊平郡を韓国の代表的な地域であると言い切ることは困難である。従って本研究の結果は両国の口腔の健康状態と口腔細菌叢の構成を示したものであるとは言い難い。国家間の違いを明確にするには今後両国の他の地域でも同様の検証を行っていく必要がある。

## 6. 総括

本研究では日本と韓国に住む口腔の健康な被験者の細菌構成に明確な差異があることが明らかになった。韓国人の被験者に比べ日本人の被験者の常在フローラが歯周炎関連パターンに傾いていることが日本人の歯周炎罹患率の高さにつながっている可能性が考えられる。口腔の細菌構成は食生活や生活習慣といった要因に影響を受けていることが近年指摘されている(Nasidze *et al.*, 2011, Stahringer *et al.*, 2012)。両国の違いの中から口腔常在フローラに影響を与えるものを特定することができれば、それを改善することが歯周組織の健康維持につながる新たなアプローチになりうると考えられる。

## 7. 謝辞

稿を終えるにあたり、顎顔面口腔病態学講座 歯科麻酔学分野と口腔保健推進学講座 口腔予防医学分野において研究を行う機会を頂いたことを感謝致します。麻酔の面白さを臨床、研究両方においてご指導、ご助言いただきました歯科麻酔学分野 横山武志教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究を実現に導いて下さいました口腔保健推進学講座 口腔予防医学分野 山下喜久教授に感謝申し上げるとともに、同分野 竹下徹 准教授ならびに古田美智子 助教には研究に関しての多大なるご指導、ご協力を賜りましたことを心から御礼申し上げます。また、大学院生活を実りあるものにして下さいました両分野の皆様は心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたりご協力いただきましたソウル大学校予防歯科分野 キム・ヒュンドク教授、ハン・ドンフン准教授に心より御礼申し上げます。また、同分野の研究員の皆様、ソウル大学校歯医学専門院の学生の皆様には約一ヶ月間に渡り早朝から深夜まで調査・研究にご協力を頂きました。誠に有難うございました。そして、韓国において私の拙い韓国語を一生懸命理解しようとして下さり、また快く調査にご協力下さいました受診者の皆様に感謝致します。最後に、韓国に行くため一ヶ月家を空けた時も、帰国後に研究でしばしば深夜の帰宅になった時も、何も言わずに支えてくれた妻・綾へこの場をお借りしてお礼を言います。ありがとう。

## 8. 参考文献

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK *et al* (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* **7**: 335-336.

Chen T, Yu WH, Izard J, Baranova OV, Lakshmanan A, Dewhirst FE (2010). The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford)*: baq013.

Darveau RP, Hajishengallis G, Curtis MA (2012). Porphyromonas gingivalis as a potential community activist for disease. *J Dent Res* **91**: 816-820.

Dental Health Division of Health Policy Bureau Ministry of Health Labour and Welfare Japan (2006). *Report on the Survey of Dental Diseases 2005 by Health Policy Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare Japan.*

Dental Health Division of Health Policy Bureau Ministry of Health Labour and Welfare Japan (2012). *Report on the Survey of Dental Diseases 2011 by Health Policy Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare Japan: Tokyo.*

Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, Booth CJ *et al* (2011). NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* **145**: 745-757.

Garrett WS, Gallini CA, Yatsunenko T, Michaud M, DuBois A, Delaney ML *et al* (2010). Enterobacteriaceae act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cell Host Microbe* **8**: 292-300.

Haas BJ, Gevers D, Earl AM, Feldgarden M, Ward DV, Giannoukos G *et al* (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res* **21**: 494-504.

Hata J, Ninomiya T, Hirakawa Y, Nagata M, Mukai N, Gotoh S *et al* (2013). Secular trends in cardiovascular disease and its risk factors in Japanese: half-century data from the Hisayama Study (1961-2009). *Circulation* **128**: 1198-1205.

Hugo Pan-Asian SNP Consortium, Abdulla MA, Ahmed I, Assawamakin A, Bhak J, Brahmachari SK *et al* (2009). Mapping human genetic diversity in Asia. *Science* **326**: 1541-1545.

Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Periasamy S, Jakubovics NS (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol* **8**: 471-480.

Korea Center for Disease Control and Prevention & Ministry of Health and Welfare (2008). *Korean national health and examination surveys: the 4th surveys*. Available at <http://knhanes.cdc.go.kr/>

Korea Center for Disease Control and Prevention & Ministry of Health and Welfare (2010). *Korean national health and examination surveys: the 5th surveys*. Available at <http://knhanes.cdc.go.kr/>

Lee S, Sung J, Lee J, Ko G (2011). Comparison of the gut microbiotas of healthy adult twins living in South Korea and the United States. *Appl Environ Microbiol* **77**: 7433-7437.

Lee WC, Lee MJ, Kim JS, Park SY (2001). Foodborne illness outbreaks in Korea and Japan studied retrospectively. *J Food Prot* **64**: 899-902.

Lozupone C, Knight R (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8228-8235.

Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS (2003). Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol* **30**: 644-654.

Ministry of Health Labour and Welfare of Japan (2009). *The National Health and Nutrition Survey in Japan [in Japanese]*. Available from URL: <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyuu/h21-houkoku.html>.

Nasidze I, Li J, Schroeder R, Creasey JL, Li M, Stoneking M (2011). High diversity of the saliva microbiome in Batwa Pygmies. *PLoS One* **6**: e23352.

Organisation of Economic Co-operation and Development [OECD] (2013). *Education at a glance 2013: OECD Indicators*. OECD Publishing.

<http://dx.doi.org/10.1787/eag-2013-en>.

Perez-Enciso M, Tenenhaus M (2003). Prediction of clinical outcome with microarray data: a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) approach. *Hum Genet* **112**: 581-592.

R Development Core Team (2012). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Said HS, Suda W, Nakagome S, Chinen H, Oshima K, Kim S *et al* (2013). Dysbiosis of Salivary Microbiota in Inflammatory Bowel Disease and Its Association With Oral Immunological Biomarkers. *DNA Res*.

Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D *et al* (2012). Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol* **13**: R42.

Shimazaki Y, Akifusa S, Takeshita T, Shibata Y, Doi Y, Hata J *et al* (2011). Effectiveness of the salivary occult blood test as a screening method for periodontal status. *J Periodontol* **82**: 581-587.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. (1998). Microbial

complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* **25**: 134-144.

Stahringer SS, Clemente JC, Corley RP, Hewitt J, Knights D, Walters WA *et al* (2012). Nurture trumps nature in a longitudinal survey of salivary bacterial communities in twins from early adolescence to early adulthood. *Genome Res* **22**: 2146-2152.

Takeshita T, Nakano Y, Yamashita Y (2007). Improved accuracy in terminal restriction fragment length polymorphism phylogenetic analysis using a novel internal size standard definition. *Oral Microbiol Immunol* **22**: 419-428.

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

World Health Organization (2013). *World Health Statistics*. World Health Organization, Geneva, Switzerland: Geneva, Switzerland.

Yamanaka W, Takeshita T, Shibata Y, Matsuo K, Eshima N, Yokoyama T *et al* (2012). Compositional stability of a salivary bacterial population against supragingival microbiota shift following periodontal therapy. *PLoS One* **7**: e42806.

Zaura E, Keijsers BJ, Huse SM, Crielaard W (2009). Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiol* **9**: 259.