

口腔内細菌叢の網羅的多様性解析

092A04 神谷 保吉

微生物学講座

【目的】

口腔内には700種以上の細菌が生息していると推定され、特有の生息場所を求めて、それぞれの部位で特有の細菌叢を形成している。このような場が口腔内にはいくつか存在し、舌背、歯の表面、歯肉溝、さらには唾液などが細菌叢の生態学的特徴を決めている。また、口腔内細菌叢は年齢や食生活、衛生環境といった様々な要因によっても構成種が大きく異なってくる¹⁾。ヒト口腔内の生態系はその複雑な環境下ゆえに多種多様な菌が存在しているが、その半分以上の細菌は培養できていない²⁾。培養が成功しない理由としては、細胞膜が不安定で死滅しやすいことや、栄養要求性が厳しいために発育に十分な培地が作成できていないこと、極めて高度な嫌気環境を要求するなどが考えられる³⁾。しかし近年になると、遺伝子をターゲットとした培養に依存しない分子生物学的な手法の発展により、培養が困難な菌種についても解析が可能となってきた⁴⁾。

口腔内には圧倒的に多量に存在する優勢菌種が存在している。唾液の凝集素やムチンに*Streptococcus mitis*や*Streptococcus oralis*や*Streptococcus salivarius*などが繁殖し、それを元として*Actionomyces naeslundii*のような菌が増殖、さらに*Fusobacterium nucleatum*が定着する⁵⁾というものが一般的に受け入れられており、細菌叢の大部分はこのような優勢菌種に占められていると考えられる。従来の分子生物学的手法では数の多い主要な菌種が優先的に解析されてしまい、微量菌種を検出することは困難である。しかしながら、口腔内疾患と細菌の関係は未だ不明な点も多く、マイナー菌群の疾患への関与も否定できない。そのため口腔内細菌叢の解析において、より多くの菌種を検出できる手法の開発が望まれている。そこで本研究では、口腔内試料から優勢菌種を除去して微量菌種を検出する手法を開発することを目的とした。

【方法】

健康な成人3人の起床直後の唾液を滅菌されたチューブに回収し、遠心後の沈殿物を唾液中の菌体サンプルと

して使用した。シリコンビーズ入りのチューブを用いて物理破砕により菌体からDNAを抽出した。本研究に用いた手法であるDNA deductionはサブトラクション技術を応用した新しい手法であり、Ordinal-PCRによって優先的に増幅する菌種を除去し、それによって微量に存在する菌種の検出を目的とするものである。抽出したDNAを用いて末端にビオチン付加したプライマーでPCRを行い、優位に増幅した優勢菌種のビオチン-PCR産物と唾液サンプルDNAをハイブリダイゼーションさせた。ハイブリッドした優勢菌種のDNAは磁性アビジンビーズに結合させて磁石によって除去し、本操作を繰り返すことで微量菌群の割合を増加させた。最終的に回収されたDNAを用いて16S rRNA遺伝子を標的とし、DGGE法やメタゲノム解析を行い、検出菌種の変化を評価した。系統解析を行う際、シーケンスデータの97%の相同性をもって同一菌種と特定した。また、リアルタイムPCRによってdeductionによるDNAの除去効率の測定を行った。

【結果】

deduction前よりも処理後のものにおいて多くの菌種が見られ、細菌叢解析の多様性の増加がみられた。種レベルで解析を行うと、優勢菌種として*Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Prevotella melaninogenica*, *Gemella haemolysans*, *Veillonella parvula*などが共通して存在したが、deduction後のサンプルではこれらのリード数上位10菌種の検出頻度が7.5~10.5%減少した。それに伴い、*Bradyrhizobium japonicum*や*Mycobacterium chitae*, *Helicobacter cinaedi*などの処理前には見られなかった菌種のシーケンスがみられ、deduction処理による微量菌種の検出及び口腔内細菌叢の変化が確認された。既存菌種とのシーケンスの相同性が97%以下のものも各サンプルにおいて5%程度見られ、それらについて解析を行った結果*Prophyromonas*属や*Veillonella*属の新菌種と予想される配列を検出することができた。また、メタゲノム解析によって得られたシーケンスにはuncultured bacterium

も含まれていた。

【考察】

リアルタイムPCRの結果から、Ordinal-PCRによって増幅した菌種が十分に除去されていると考えられた。そして、deduction処理前後におけるDGGE法とメタゲノム解析の結果から、本手法を用いることによって優勢菌種の検出頻度が減少し、さらに微量菌群の増加と検出される細菌叢の変化がみられたため、従来の手法では検出が困難であった微量細菌種の検出が可能であることが明らかとなった。しかし、上位10菌種の減少率は7.5%~10.5%とリアルタイムPCRの結果と一致せず、本手法には改善の余地があることが示唆されている。系統樹を用いた系統解析においては、新たな分類群に属すると思われるシーケンスもメタゲノム解析から得られており、本手法の有効性が示された。

以上の結果から、DNA deduction処理を用いることによって、通常のPCRを用いた手法では検出不可能であった微量菌群を検出することができ、細菌叢の新たな一面を発見することができると考えられる。しかし、優勢菌種の除去が完全になされているとはいえないため、微量細菌群がすべて検出されているとは言い切れない。そのため、DNA deductionの更なる最適化を行うことによって、口腔内細菌叢の解析における有用な手法になるのではないかと考えられる。

【文献】

- 1) BMC Genomics, **11**, 523 (2010),
- 2) Oral Microbiol. Immunol., **23(2)**, 112-118 (2008),
- 3) Microbiol., **41**, 558-563 (2003),
- 4) J. Periodont. Res., **40**, 227-285 (2005),
- 5) Microbiol. Mol. Rev., **66**, 486-505 (2002)