

原著

## 一般地域住民における口腔内環境と口腔細菌叢に関する研究

野口 貴雄<sup>1,2)</sup> 石崎 博<sup>1)</sup> 田村 好 拡<sup>1)</sup> 小山 俊 朗<sup>1)</sup>  
長内 俊之<sup>1)</sup> 佐竹 杏 奈<sup>1)</sup> 福田 はるか<sup>1)</sup> 秋山 なつみ<sup>1)</sup>  
沢田 かほり<sup>3)</sup> 井原 一 成<sup>3)</sup> 中路 重之<sup>3)</sup> 小林 恒<sup>1)</sup>

**抄録** 口腔内細菌の中でも侵襲性菌周病の原因菌とされる *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* 及び *Treponema denticola* の3種は Red complex と呼ばれ、歯周病への関与の他、多くの全身疾患リスクを高めていることが知られている。そして、口腔内細菌の健康への関与が腸内細菌とともに注目されている。本研究では、舌苔の菌周病菌の中で特に Red complex に着目し、口腔内環境と Red complex との関係を疫学的に調査した。1,063人の地域住民の舌苔から検体を採取し、次世代シーケンス解析により網羅的に細菌検出したところ43種類の細菌が検出された。その中で菌周病菌とされる13種類を選択して菌周病菌に影響を及ぼす因子について検討し、さらに Red complex に与える要因を多変量解析により検討した。その結果、舌苔中の Red complex に有意に関連している因子は菌周病の有無 ( $P=0.000002$ )、年齢 ( $P=0.00008$ )、う蝕本数 ( $P=0.0002$ )、喫煙 ( $P=0.008$ ) であった。Red complex は歯周ポケットのみではなく舌苔中にも存在し、口腔内環境と相互に関連していることが明らかとなった。

弘前医学 71: 46—54, 2020

**キーワード**：口腔内細菌；Red complex；次世代シーケンス解析。

ORIGINAL ARTICLE

## Study of general local residents's relationship between oral environment and oral bacterial flora

Takao Noguchi<sup>1,2)</sup>, Hiroshi Ishizaki<sup>1)</sup>, Yoshihiro Tamura<sup>1)</sup>, Toshiaki Oyama<sup>1)</sup>,  
Toshiyuki Osanai<sup>1)</sup>, Anna Satake<sup>1)</sup>, Haruka Fukuta<sup>1)</sup>, Natsumi Akiyama<sup>1)</sup>,  
Kaori Sawada<sup>3)</sup>, Kazushige Ihara<sup>3)</sup>, Shigeyuki Nakaji<sup>3)</sup> and Wataru Kobayashi<sup>1)</sup>

**Abstract** Among several oral bacteria, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* which are assumed to cause invasive periodontal disease are called Red complex. It is known that these bacteria influence oral health and enhance a risk of systemic diseases. A lot of attention has been paid to the influence of these bacteria on human health along with the intestinal microflora. In the present study, we focused on the periodontal disease-related pathogens especially the Red complex which were isolated from tongue coating, and their epidemiological relationship to the oral environment was investigated. By the next-generation sequencing analysis, 43 bacterial genera from 1,063 Hirosaki city's residents were detected. Thirteen bacterial genera which are likely to affect the periodontal disease were selected and their relationship to the oral environment was examined. Moreover, the factors affecting to the Red complex was investigated by the multiple regression analysis. The factors which affect the Red complex are the presence of periodontal disease ( $P=0.000002$ ), age ( $P=0.00008$ ), numbers of caries tooth ( $P=0.0002$ ) and smoking ( $P=0.008$ ). These results demonstrated that the Red complex exists not only in periodontal pocket but also in tongue coating and it is related to the oral environment.

Hirosaki Med. J. 71: 46—54, 2020

**Key words**: oral bacteria; Red complex; next-generation sequence analysis.

<sup>1)</sup> 弘前大学大学院医学研究科歯科口腔外科学講座

<sup>2)</sup> 青森労災病院歯科口腔外科

<sup>3)</sup> 弘前大学大学院医学研究科社会医学講座

別刷請求先：野口貴雄

令和2年4月8日受付

令和2年7月10日受理

<sup>1)</sup> Department of Dentistry and Oral Surgery, Hirosaki University Graduate School of Medicine

<sup>2)</sup> Dentistry and Oral Surgery, Aomori Rosai Hospital

<sup>3)</sup> Department of Social Medicine, Hirosaki University Graduate School of Medicine

Correspondence: T. Noguchi

Received for publication, April 8, 2020

Accepted for publication, July 10, 2020

## 諸 言

口腔には微生物が700種類以上存在し、その数も唾液1 mL中に $10^8 \sim 10^9$ 個あると言われ、これら口腔細菌叢の健康への関与が腸内細菌叢とともに注目されている<sup>1, 2)</sup>。

口腔内細菌の中でも侵襲性歯周病の原因菌とされる *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* 及び *Treponema denticola* の3種は Red complex と呼ばれ、歯周病への関与は様々な知見から明らかとなっている<sup>3, 4)</sup>。そして歯周病は罹患率が高いこともあり、心筋梗塞や狭心症などの原因となる動脈硬化症、糖尿病及び関節リウマチなど多くの全身疾患のリスクを高めていることが報告されており<sup>5, 6)</sup>、最近では口腔内の歯周病菌である *Fusobacterium* が大腸がんの発症に関与していることが報告されている<sup>7)</sup>。

歯周病が全身疾患に影響を及ぼす病因メカニズムとして3つが考えられる。①歯周ポケットから細菌が血管内に直接侵入する菌血症によるもの、②歯周炎により歯周組織で産生されたサイトカインやプロスタグランジン等の炎症性メディエーターが血流を介して全身の組織・臓器に影響を与えるもの、③口腔内細菌が消化管または気管に流入して直接的に影響を及ぼしているものである<sup>8)</sup>。特に、口腔内嫌気性菌による誤嚥性肺炎の発症は高齢化社会において特に重要な懸念事項であるが、口腔内を清掃することで誤嚥性肺炎の予防につながる事が明らかとなっている<sup>9, 10, 11)</sup>。口腔内細菌叢は部位によって差があり、歯と歯肉の付着部に形成される歯周ポケット内は出血が頻繁に起きるとともに嫌気度が高まる部位である。歯肉縁下プラークは偏性嫌気性菌がより優勢な部位となり、歯周病に関して重要な Red complex が多く存在している。舌苔は舌背の中央から舌根部にかけて堆積する微生物や食物残渣、剥離上皮などからなる膜状の凝集塊であり、年齢やう蝕、歯周疾患の状態に関わらず観察される<sup>12, 13)</sup>。舌苔は細菌の母床であり口臭の原因の他、高齢者においては誤嚥性肺炎と関係している<sup>14)</sup>。舌苔中の細菌に関する研究では、特定の歯周病菌に限定して調査した結果、歯周炎を有する者には歯周ポケットと同様の歯周病菌が舌苔中にも確認されてい

る<sup>15, 16)</sup>。

そこで本研究では、舌苔中の口腔内細菌において口腔内環境の中でも歯周病の存在が口腔内細菌に強く影響を及ぼしているとの仮説を立て、一般地域住民を対象とした口腔内環境と舌苔における口腔細菌叢との関係について研究した。

## 対象及び方法

2016年度岩木健康増進プロジェクト・プロジェクト健診を受診した20歳以上の被検者1,148人のうち無歯顎者を除いた1,063人を対象とした。本プロジェクトは青森県弘前市岩木地区の住民の希望者を対象として、生活習慣病予防と健康の維持・増進、寿命の延長を目指して企画されたものである。対象者には検査の目的と方法を説明し、あらかじめ文書で同意を得た上で調査を行った。本研究は、弘前大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。

### 1 調査項目

対象者1,063人(男性426人、女性637人)、年齢20~93歳、平均年齢53.2歳であった。事前に自己記入式質問用紙を送付し、性別、年齢、アルコール摂取量及び喫煙について調査を行った。口腔乾燥の自覚、歯磨き回数及び義歯の使用については健診当日に自己記入式質問用紙を配布し、記入された回答を確認した上で質問用紙を回収し調査を行った。Body Mass Index (BMI) は身体測定で計測された身長・体重から算出した。口腔内診査は歯科医師が行い、現在歯数・う蝕歯数を数え、歯周ポケットの深さはCommunity Periodontal Index (CPI) プローブを用いて測定し4 mm 以上を歯周病あり、4 mm 未満を歯周病なしと判断した。なお、歯周ポケット測定を標準化するために検者間でのキャリブレーションを行った上で調査した(表1)。

### 2 口腔内細菌の解析

口腔内細菌は、事前に配布した舌苔採取キットを使用して採取した。各対象者が健診当日の起床直後に綿棒で舌背部を数回ぬぐって舌苔を採取し、健診会場にて回収した。回収した検体を健診

表1 対象者の特徴

人数(人)	1,063
性別(人)	男性: 426, 女性: 637
年齢(歳)	53.2 ± 15.2
アルコール摂取量(g)	13.1 ± 22.5
飲酒なし(%)	51.7
現在飲酒(%)	43.8
過去に飲酒(%)	4.5
年間喫煙量(箱)	107.8 ± 171.3
喫煙歴なし(%)	62.9
現在喫煙(%)	17.5
過去に喫煙(%)	19.6
口腔乾燥の自覚率(%)	30.2
歯磨き回数(回)	2.2 ± 0.8
義歯の使用率(%)	25.3
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	22.9 ± 3.4
現在歯数(本)	23.8 ± 7.0
う蝕本数(本)	0.8 ± 2.0
歯周病罹患率(%)	51.1

人及び%以外の数値は、(平均値) ± (標準偏差)を表す。

終了後に株式会社テクノスルガラボに移送し解析を行った。検体はx ジルコニアビーズを用いて Fast Prep FP100A Instrument (MP Biomedicals, USA)による破碎を行った懸濁液200µLについて Magtration System 12GC (Precision System Science, Japan)及び MagDEA DNA 200 (Precision System Science, Japan)を用いて細菌DNAの抽出を行った。最終的にND-1000 (NanDrop Technologies, USA)を用いてDNAサンプルを10ng/µLに調整した。次に、細菌の16S rDNAにおけるV3-V4領域の約430bpを増幅するためのプライマーであるPro341F及びPro805Rを使用し、Rotor-Gene Q quantitative thermal cyler (Qiagen, Germany)を用いてPCR増幅を行った。PCR増幅されたDNAについてIllumina Miseq Reagent Kit version 2及びIllumina Miseq sequencing system (Illumina, San Diego, CA, USA)を用いてプライマーを除く約430bpを決定した。得られたDNA配列について、Metagenome@KIN analysis software (World Fusion, Japan)を用いてデータベースとし、Techno Suruga Lab microbial Identification database DB-BA 9.0 (Techno Suruga Laboratory, Japan)を用いて細菌の検索を行った。DNAの識別は97%以上の相対率が得られたものの中で最上位の菌種を近縁種として推定し

た。次世代シーケンス解析はTakahashiらの方法に従った<sup>17)</sup>。得られた菌種のgenus(属)の段階について全体に対する割合を算出し、解析に用いた。

ほぼ全ての住民において検出された細菌属は43属であった(表2)。その中で特に歯周病に関連するとされる歯周病菌13属を選択し<sup>18)</sup>、口腔内環境が口腔細菌叢に与える影響について検討した。検討に用いた数値は細菌全体の中での各細菌属の割合を用いた。

### 3 統計解析

歯周病菌13属の比率との関連性の解析には単変量解析として歯周病の有無(「歯周病あり」: 歯周ポケット4mm以上または「歯周病なし」: 歯周ポケット4mm未満で分割)、う蝕の有無、残存歯数(「20歯以上」または「20歯未満」で分割)、口腔乾燥自覚の有無、1日の歯磨き回数(「2回以上」または「1回」で分割)、義歯使用の有無に分類して中央値の差の検定をMann-Whitney U検定を用いて行った。Red complexは*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*及び*Treponema denticola*の3菌種の総和である。今回の検討では細菌属の割合を用いて検討するため*Porphyromonas*属、*Treponema*属及び*Tannerella*属の割合の総和と実際の細菌種の割合の総和との相関関係を最初に解析したところ、有意に正に相関していることを確認した(Pearsonの相関係数: 0.93,  $p < 0.0001$ ) (図1)。よって本研究ではRed complex比に関して細菌属の割合を用いて検討した。Red complexに関しては*Porphyromonas*属比、*Tannerella*属比、*Treponema*属比及びこれら3菌属の比を総和したRed complex比に影響を与えられ得る因子を独立変数として重回帰分析(ステップワイズ法)を行い、相関関係を解析検討した。

統計解析はSPSS Statistics 24 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA)を使用し、 $p < 0.05$ で有意差ありと判定した。

## 結 果

### 1 対象者の特長(表1)

対象者1,063人の各項目の平均値、歯周病の罹患率、義歯の使用率及び口腔乾燥の自覚率は表1

表2 検出された細菌(属)のリスト

NO.	細菌(属)	検出率	NO.	細菌(属)	検出率		
1	<i>Abiotrophia</i>	0.08	26	<i>Megasphaera</i>	0.96		
2	<i>Actinomyces</i>	4.63	27	<i>Mycoplasma</i>	0.02		
3	<i>Aggregatibacter</i>	0.11	28	<i>Neisseria</i>	7.01		
4	<i>Alloprevotella</i>	0.45	29	<i>Oribacterium</i>	0.29		
5	<i>Alloscardovia</i>	0.02	30	<i>Parvimonas</i>	0.25		
6	<i>Atopobium</i>	0.67	31	<i>Peptostreptococcus</i>	0.32		
7	<i>Bacteroides</i>	0.01	32	<i>Porphyromonas</i>	0.27		
8	<i>Bifidobacterium</i>	0.03	33	<i>Prevotella</i>	16.25		
9	<i>Campylobacter</i>	0.86	34	<i>Rothia</i>	4.38		
10	<i>Capnocytophaga</i>	0.44	35	<i>Selenomonas</i>	0.07		
11	<i>Cardiobacterium</i>	0.02	36	<i>Solobacterium</i>	0.46		
12	<i>Catonella</i>	0.11	37	<i>Stomatobaculum</i>	0.34		
13	<i>Corynebacterium</i>	0.18	38	<i>Streptococcus</i>	24.63		
14	<i>Cryptobacterium</i>	0.01	39	<i>Tannerella</i>	0.03		
15	<i>Dialister</i>	0.07	40	<i>Treponema</i>	0.07		
16	<i>Eubacterium</i>	0.05	41	<i>Veillonella</i>	10.31		
17	<i>Filifactor</i>	0.03	42	<i>sp.Eubacterium nodatum incertae_sedis</i>	0.01		
18	<i>Fusobacterium</i>	2.69	43	<i>sp.Eubacterium sulci incertae_sedis</i>	0.40		
19	<i>Gemella</i>	2.45	(小計)		89.14		
20	<i>Granulicatella</i>	2.55	the others(264 genera + rejected) 10.86				
21	<i>Haemophilus</i>	6.70				(計) 100.00	
22	<i>Kingella</i>	0.03					
23	<i>Lachnoanaerobaculum</i>	0.30					
24	<i>Lactobacillus</i>	0.13					
25	<i>Leptotrichia</i>	0.48					

表内の数値は、各対象者から検出された細菌数の割合の平均値(%)を示す。

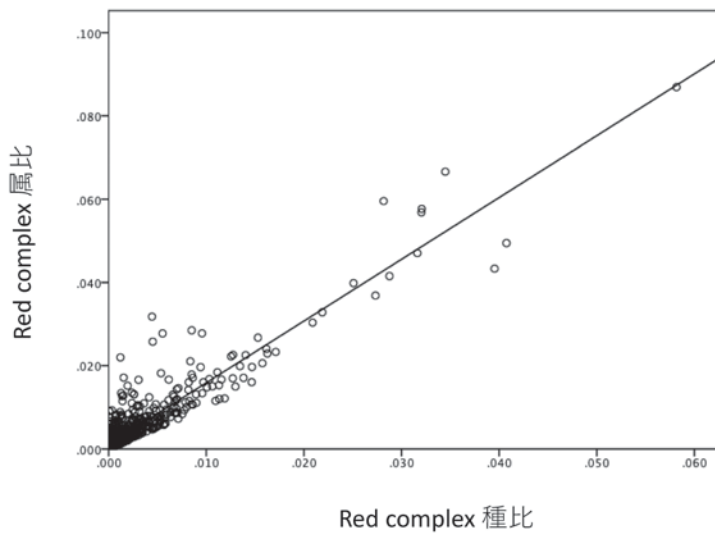


図1 Red complex の細菌種比と細菌属比との相関関係。

Red complex 種比は *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* 及び *Treponema denticola* の細菌種の比の総和を表す。また、Red complex 属比は *Porphyromonas* 属、*Tannerella* 属及び *Treponema* 属の比の総和を表す。Pearson の相関係数：0.93,  $p < 0.0001$ .

に記載のとおりである。

## 2 検出された歯周病関連細菌と口腔内環境との関係について(表2, 3)

43種類の細菌属が一定量検出され(表2), その中で歯周病菌と関連する細菌属13属を抜粋した(表3). 口腔内環境は、歯周病の有無, う蝕の有無, 残存歯数, 口腔乾燥の自覚の有無, 1日

表3 検出された歯周病関連細菌と口腔内環境との関係

NO.	細菌(属)	歯周病の有無			う蝕の有無			残存歯数		
		あり (507名)	なし (543名)	p 値	あり (343名)	なし (718名)	p 値	20歯以上 (856名)	20歯未満 (207名)	p 値
1	<i>Aggregatibacter</i>	0.0583	0.0470	0.148	0.0590	0.0503	0.042	0.0596	0.0226	0.001
2	<i>Campylobacter</i>	0.6846	0.6556	0.457	0.6365	0.6850	0.193	0.6733	0.6597	0.364
3	<i>Capnocytophaga</i>	0.2034	0.2264	0.498	0.2013	0.2222	0.187	0.2277	0.1516	0.001
4	<i>Dialister</i>	0.0398	0.0316	0.001	0.0395	0.0337	0.003	0.0343	0.0395	0.596
5	<i>Eubacterium</i>	0.0181	0.0100	0.001	0.0141	0.0129	0.086	0.0142	0.0099	0.132
6	<i>Peptostreptococcus</i>	0.2217	0.2133	0.397	0.2316	0.2115	0.288	0.2404	0.0965	0.001
7	<i>Porphyromonas</i>	0.1443	0.0775	0.001	0.1217	0.0939	0.053	0.0987	0.1242	0.850
8	<i>Prevotella</i>	15.6949	15.7721	0.357	15.6734	15.7354	0.949	15.6362	16.6263	0.818
9	<i>Selenomonas</i>	0.0478	0.0371	0.004	0.0475	0.0394	0.067	0.0412	0.0528	0.055
10	<i>Streptococcus</i>	23.2633	23.0821	0.794	23.1128	23.2514	0.333	22.4331	25.5344	0.001
11	<i>Tannerella</i>	0.0131	0.0048	0.001	0.0122	0.0079	0.028	0.0081	0.0120	0.017
12	<i>Treponema</i>	0.0329	0.0222	0.001	0.0327	0.0241	0.026	0.0278	0.0234	0.540
13	<i>Veillonella</i>	9.9897	9.6965	0.377	9.5317	9.9993	0.751	9.6492	10.7552	0.011

NO.	細菌(属)	口腔乾燥の自覚			1日の歯磨き回数			義歯使用の有無		
		あり (321名)	なし (742名)	p 値	2回以上 (864名)	1回 (170名)	p 値	あり (269名)	なし (794名)	p 値
1	<i>Aggregatibacter</i>	0.0557	0.0520	0.686	0.0518	0.0565	0.711	0.0254	0.0625	0.001
2	<i>Campylobacter</i>	0.6784	0.6647	0.691	0.6577	0.7412	0.896	0.7144	0.6647	0.669
3	<i>Capnocytophaga</i>	0.2023	0.2166	0.384	0.2076	0.2619	0.062	0.1721	0.2231	0.008
4	<i>Dialister</i>	0.0425	0.0319	0.022	0.0343	0.0379	0.028	0.0341	0.0360	0.504
5	<i>Eubacterium</i>	0.0150	0.0128	0.193	0.0124	0.0185	0.701	0.0114	0.0140	0.395
6	<i>Peptostreptococcus</i>	0.1575	0.2344	0.001	0.2255	0.2016	0.449	0.1300	0.2411	0.001
7	<i>Porphyromonas</i>	0.1163	0.0959	0.339	0.0984	0.1348	0.140	0.1371	0.0966	0.378
8	<i>Prevotella</i>	15.1046	15.8717	0.380	15.5406	15.9565	0.961	16.1643	15.6362	0.661
9	<i>Selenomonas</i>	0.0471	0.0390	0.294	0.0416	0.0503	0.437	0.0483	0.0405	0.030
10	<i>Streptococcus</i>	24.4199	22.4770	0.002	22.7850	24.1302	0.024	24.5826	22.4331	0.001
11	<i>Tannerella</i>	0.0094	0.0082	0.313	0.0083	0.0132	0.086	0.0126	0.0076	0.001
12	<i>Treponema</i>	0.0253	0.0277	0.796	0.0253	0.0386	0.679	0.0238	0.0272	0.930
13	<i>Veillonella</i>	10.4795	9.7445	0.052	9.7612	10.2680	0.895	10.5515	9.6861	0.076

Mann-Whitney U 検定

表内の p 値以外の数値は、細菌数の割合(%)の中央値を表す。

(表2の中での割合を示すため、13属を合計しても100%とはならない。)

の歯磨き回数及び義歯使用の有無について調査した。

## (1) 歯周病と歯周病菌の関係について

「歯周病なし」群と比較して、「歯周病あり」群では *Dialister*, *Eubacterium*, *Porphyromonas*, *Selenomonas*, *Tannerella* 及び *Treponema* の6種類の菌の割合が有意に多く検出された。

## (2) う蝕と歯周病菌の関係について

「う蝕なし」群と比較して、「う蝕あり群」では *Aggregatibacter*, *Dialister*, *Tannerella* 及び *Treponema* の4種類の菌の割合が有意に多く検出された。

## (3) 残存歯数と歯周病菌の関係について

「20歯未満」群と比較して、「20歯以上」群では

*Aggregatibacter*, *Capnocytophaga* 及び *Peptostreptococcus* の3種類の菌の割合が有意に多く検出された。*Streptococcus*, *Tannerella* 及び *Veillonella* の3種類の菌の割合は逆に「20歯未満」群で有意に多く検出された。

## (4) 口腔乾燥自覚と歯周病菌の関係について

「口腔乾燥自覚なし」群と比較して、「口腔乾燥自覚あり」群では *Dialister* 及び *Streptococcus* の2種類の菌の割合が有意に多く検出された。*Peptostreptococcus* は逆に「口腔乾燥自覚なし」群で有意に多く検出された。

## (5) 歯磨き回数と歯周病菌の関係について

1日の歯磨き回数「2回以上」群と比較して、

表4 Red complex 各3菌属及びRed complexに影響する因子の検討

変数	<i>Porphyromonas</i>		<i>Tannerella</i>		<i>Treponema</i>		Red complex	
	$\beta$	有意確率	$\beta$	有意確率	$\beta$	有意確率	$\beta$	有意確率
年齢	0.118	0.000038	0.173	0.000020	-	-	0.123	0.000080
年間喫煙量	0.090	0.009000	0.064	0.034000	0.071	0.004000	0.082	0.008000
歯周病の有無	0.161	0.000001	0.134	0.000010	0.126	0.000043	0.162	0.000002
う蝕歯数	0.087	0.005000	0.172	0.000170	0.152	0.000001	0.114	0.000200

重回帰分析(ステップワイズ法)

従属変数: *Porphyromonas*, *Tannerella*, *Treponema* 及び Red complex.

独立変数: 年齢, 性別, BMI, アルコール摂取量, 年間喫煙量, 歯周病の有無, う蝕歯数, 残存歯数及び義歯使用の有無, 性別, BMI, アルコール摂取量, 残存歯数及び義歯使用の有無からは有意差が得られなかった.

「1回」群では *Dialister* 及び *Streptococcus* の2種類の菌の割合が有意に多く検出された.

(6) 義歯使用と歯周病菌の関係について

「義歯使用あり」群と比較して, 「義歯使用なし」群では *Aggregatibacter*, *Capnocytophaga* 及び *Peptostreptococcus* の3種類の菌の割合が有意に多く検出された. *Selenomonas*, *Streptococcus* 及び *Tannerella* の3種類の菌の割合は逆に「義歯使用あり」群で有意に多く検出された.

3 Red complex に影響する因子の検討について(表4)

口腔細菌叢に影響を与えると考えられる年齢, 性別, BMI, アルコール摂取量, 年間喫煙量, 歯周病の有無, う蝕歯数, 残存歯数及び義歯使用の有無を独立変数として, それぞれ *Porphyromonas*, *Tannerella*, *Treponema* 及びこれら3菌属をまとめた Red complex の割合を従属変数として重回帰分析(ステップワイズ法)を行った. その結果, 年齢において *Treponema* に有意な関連は認められなかったが *Porphyromonas*, *Tannerella* 及び Red complex に有意な関連が認められた. また, 年間喫煙量, 歯周病の有無及びう蝕歯数では3菌属及び Red complex とそれぞれ有意に関連していた.

考 察

口腔には歯が存在し食物を摂取するという機能以外に, 体外環境と接する部位であることから, 口腔内細菌叢は口腔内外の様々な影響を受けることが予想される. 本研究では, 口腔内細菌叢の中でも特に歯周病菌に着目して検討したところ, 歯

周病菌は歯周ポケットに限定されるのではなく舌苔中にも存在し, 多様な口腔内環境と相関関係にあることが確認された.

口腔内環境は個々人で大きな違いがあり, う蝕・歯周病等の各種疾病が存在する他, 歯数, 義歯の使用及び口腔清掃状況など千差万別である. 一方で, 口腔内細菌叢に関する研究報告はあるものの, 少人数を対象とした研究もしくは特定の細菌のみを対象とした研究がほとんどであり, 口腔内細菌を網羅的に検出し, 1,000人以上の大規模な地域住民を対象とした大規模研究は少ない. 竹下らによる久山研究では2,343人の住民の唾液中の口腔内細菌を網羅的に検出し, その細菌叢をクラスター分析により2分して口腔健康関連因子と細菌叢全体の関係を検討している<sup>19)</sup>. その結果, 年齢, BMI, 残存歯数, う蝕の有無, 歯周病と喫煙が両群に有意差を認めたと報告している. 他の口腔細菌に関する研究も同様に唾液や歯周ポケットから検体を採取しているものが多く, 舌苔を対象とした研究は少ない<sup>20, 21)</sup>. 舌苔の細菌には経時的安定性があり, 口腔細菌の母床として重要で舌苔を除去するとデンタルプラークの形成が抑制されたとの報告もある<sup>22)</sup>. また, 舌苔中の細菌が唾液中の大半を占めるとされ, 口腔内細菌叢を考える際には舌苔中の細菌叢が重要であるとされている<sup>23)</sup>.

今回の結果から13種の歯周病菌では *Prevotella*, *Streptococcus* 及び *Veillonella* の3種類の常在菌が他の菌に比較して多く検出されていた. *Prevotella* 及び *Veillonella* の2菌種は口腔内環境には左右されず検出量は安定していた. これらは菌量が多いために安定し, 他からの影響を受けにくい可能性があると思われた. 一方 *Streptococcus* は, う蝕

の原因菌でもあり残存歯数及び歯磨き回数と関連していた。 *Streptococcus* が多くなるとう蝕により歯数が減少しやすくなり、歯磨き回数が多くなると *Streptococcus* が減少するという結果と一致していると思われる。

口腔内環境ごとに単変量解析で検討したところ、歯周病の有無、残存歯数及び義歯使用の有無が最も多くの細菌と統計学的に有意な関連を示していたが、全身疾患と最も関係が強い歯周病と歯周病菌の中で最も侵襲性が高い Red complex に焦点を絞って検討を行った。

口腔細菌は胃を通過する際に胃酸によって殺菌され、腸管の上皮細胞が分泌する抗菌タンパク質等によって簡単には腸内細菌に影響を与えないと考えられる。しかし、Red complex の中でも特に *Porphyromonas gingivalis* は組織や細菌叢に対して強い影響を持つ細菌であり、反復経口投与が腸内細菌叢の変化を引き起こし<sup>24)</sup>、内毒素血症を誘発することで、全身性炎症及びインスリン抵抗性を誘導することがマウスを使った実験で明らかにされている<sup>25)</sup>。さらに、認知症の脳内に *Porphyromonas gingivalis* が同定され、マウスでの脳のコロニーの形成とアミロイドβの産生を促進させるとの報告もある<sup>26)</sup>。このように Red complex は歯周病という母床の中で発育し、全身疾患に強い影響を及ぼしている可能性がある。

本研究から、*Porphyromonas*, *Tannerella*, *Treponema* 及びこれら3菌属を合計した Red complex の重回帰分析から年齢、喫煙、歯周病の有無及びう蝕歯数と有意に関連していることが確認された。喫煙は歯周病の増悪因子であり、年齢が上がるに従い歯周病罹患率は高くなる傾向にあるため喫煙と年齢の2つの要因は Red complex のコントロールに非常に重要だと思われる。Red complex を中心とした歯周病菌をコントロールするためには歯周病の治療を徹底することが必要となるが、そのためには各自の口腔清掃状態の向上が最も重要で、定期的な指導と動機付けが必要となる。う蝕との有意な相関を得られたのは、う蝕が多い口腔内環境は口腔清掃状態が不良なことから歯周病菌も多く存在する環境にあるためではないかと思われる。

竹下らの研究結果<sup>19)</sup>は口腔内細菌叢全体に与え

る要因に関する検討であるが、今回の我々の研究で明らかとなった Red complex に影響を与える口腔内環境と同様の結果であった。年齢、喫煙、歯周病の有無及びう蝕歯数は Red complex だけでなく口腔内細菌叢全体に影響を与える因子であるか、もしくは *Porphyromonas* を含む Red complex が全身疾患へ与える影響力を考慮すると口腔内細菌叢全体にも同様に強い影響力を持っていることが推察される。

内臓脂肪型肥満を背景として発症するメタボリックシンドロームは、全身の軽度の慢性炎症と関連している。その炎症を引き起こす原因として脂肪細胞から産生される生理活性物質であるアディポサイトカインが関与<sup>27, 28)</sup>し、軽度な慢性炎症は急性炎症を示さないまま年余に渡り持続・蔓延化している。

同様に歯周炎も慢性炎症が歯周組織で持続しており、歯周ポケット内で炎症性サイトカインを産生し、全身疾患に影響を及ぼしているメカニズムが推察されている<sup>29)</sup>。歯周病の罹患率は非常に高く、本研究対象者においても50%を超える罹患率であったことから、生体において慢性炎症を引き起こす主な原因は肥満と歯周炎であると言える。

歯周病は細菌感染によるものであり成人の罹患率は極めて高いことを考慮すると、口腔内細菌の変化に影響を及ぼす要因を解析し把握することは、超高齢化社会を迎えた日本において健康寿命の延伸を助長させるために重要である。また、歯周病の関連が疑われている生活習慣病の予防法の確立につながる可能性も期待される。

本研究では歯周病罹患者は、歯周ポケットが4 mm 以上となるとともに、舌苔中にも歯周病菌が存在し、口腔内環境によって歯周病菌が歯周ポケットのみでなく舌背面でも有意に変動することが明らかとなった。舌苔を口腔細菌の供給源として考えた場合、口腔内細菌を制御するためには歯や歯周ポケットのみならず、舌苔も含めて考える必要があるといえる。このことから、歯周ポケットに加えて舌苔中の歯周病菌を減らす試みが歯周病の改善につながり、歯周病による炎症性サイトカインを介した全身疾患の予防となることが期待できる。

本研究の制限として、対象者本人が検体を舌苔

から採取しているため採取条件に多少の違いがあること、横断研究であるため細菌群の増減と口腔内環境・生活環境との相互の因果関係までは言及できないことが挙げられる。

## 利益相反

全ての著者に、本研究内容に関する利益相反はない。

## 謝辞

本研究は、JST、COI及びJPMJCE1302の支援を受けたものである。

## 引用文献

- 1) 泉福英信. 口腔環境の微生物制御と全身感染症との関連性について. 臨環境医. 2014;23:102-8.
- 2) 小川智久. 口腔細菌がおよぼす全身への影響. モダンメディア. 2017;63:179-85.
- 3) 日本歯周病学会. 歯周病と全身の健康. 1版. 東京: 医歯薬出版株式会社; 2016. p88-116.
- 4) Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontology 2000. 2002;28:12-55.
- 5) 上野尚雄, 鄭漢忠, 大類晋, 中河律子, 八角直, 泉山ゆり, 戸塚靖則. 口腔微生物叢と健康との関連についての研究—第一報 老人保険施設入所高齢者における口腔微生物叢について—. 老年歯医. 2000;14:265-9.
- 6) 山崎和久. 歯周病と全身疾患の関連. 化学と生物. 2016;54:633-9.
- 7) Komiya Y, Shimomura Y, Higurashi T, Sugi Y, Arimoto J, Umezawa S, Uchiyama S, et al. Patients with colorectal cancer have identical strains of *Fusobacterium nucleatum* in their colorectal cancer and oral cavity. Gut. 2019;68:1335-7.
- 8) Lockhart PB, Bolger AF, Papapanou PN, Osinbowale O, Trevisan M, Levison ME, Taubert KA, et al. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: Does the evidence support an independent association?. Circulation. 2012;125:2520-44.
- 9) Yoneyama T, Yoshida M, Matsui T, Sasaki H, and the Oral Care Working Group. Oral care and pneumonia. The Lancet. 1999;354:515.
- 10) 米山武義, 鴨田博司. 口腔ケアと誤嚥性肺炎予防. 老年歯医. 2001;16:3-13.
- 11) 鈴木幹三, 岸本明比古, 山本俊幸, 滝沢正子, 山本素子, 吉友和夫, 加藤錠一, 他. 高齢者咽頭菌叢に関する研究. 感染症誌. 1984;58:304-11.
- 12) 高橋雅洋, 岸光男. 舌苔中の歯科疾患関連細菌と口腔内状況との関連性. 口腔衛会誌. 2006;56:137-47.
- 13) 米澤知恵, 道重文子. 舌苔の評価における動向および評価基準とその信頼性・再現性に関する文献検討. 大阪医科大学看護研究雑誌. 2018;8:116-20.
- 14) 武藤隆嗣, 譽田英喜, 前田伸子, 松本亀治, 森戸光彦. 長期療養者ならびに寝たきり者の口腔常在微生物叢に関する研究. 口腔衛会誌. 2000;50:351-60.
- 15) 米満正美, 佐藤誠, 岡田昭五郎, 大西正男. *Streptococcus mutans* の年齢別歯面別分布と二, 三の口腔内常在菌の口腔内分布に関する研究. 口腔衛会誌. 1982;32:370-7.
- 16) Frisken KW, Higgins T, Palmer JM. The incidence of periodontopathic microorganisms in young children. Oral Microbiol Immunol. 1990;5:43-5.
- 17) Takahashi H, Sai K, Saito Y, Kaniwa N, Matsumura Y, Hamaguchi T, Shimada Y, et al. Application of a combination of a knowledge-based algorithm and 2-stage screening to hypothesis-free genomic data on irinotecan-treated patients for identification of a candidate single nucleotide polymorphism related to an adverse effect. PLoS One. 2014;9:e105160.
- 18) 川端重忠, 小松澤均, 大原直也, 寺尾豊, 浜田茂幸. 口腔微生物学・免疫学. 4版. 東京: 医歯薬出版; 2016. P252-70.
- 19) Takeshita T, Kageyama S, Furuta M, Tsuboi H, Takeuchi K, Shibata Y, Shimazaki Y, et al. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama Study. Scientific Reports. 2016;6:22164.
- 20) 大西真由子. 日本人の侵襲性歯周炎患者における歯周病原性細菌の定量分析. 口腔病会誌. 2006;73:70-8.



- 21) 久野彰子, 菊谷武, 田村文誉, 関野愉, 児玉実穂, 町田麗子, 沼部幸博. 介護老人福祉施設入居者における唾液中の歯周病関連細菌とその関連因子. 老年歯医. 2008;23:12-20.
- 22) Gross A, Barnes GP, Lyon TC. Effects of tongue brushing on tongue coating and dental plaque scores. J Dent Res. 1975;54:1236.
- 23) 竹下徹, 山下喜久. 口腔常在微生物叢の構成と健康との関連. 日本乳酸菌学会誌. 2016;27:3-9.
- 24) Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskandari MA, McIntosh ML, et al. Low-Abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and the complement pathway. Cell Host Microbe. 2011;10:497-506.
- 25) Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, Minagawa T, Nakajima M, Ryder MI, Gotoh K, et al. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. Scientific Reports. 2014;4:4828.
- 26) Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, Nguyen M, et al. Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. Science Advances. 2019;5:eaau3333.
- 27) 津田直人, 菅波孝祥, 小川佳宏. 脂肪組織における慢性炎症・自然炎症と生活習慣病. 医学のあゆみ. 2011;236:243-8.
- 28) 真鍋一郎. 慢性炎症と加齢関連疾患. 日老医誌. 2017;54:105-13.
- 29) 廣畑直子, 相澤聡一, 相澤(小峯)志保子. 歯周病と全身疾患. 日大医誌. 2014;73:211-8.