

厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
口腔内細菌叢とがん，糖尿病など全身疾患との関わりとその予防戦略
分担研究報告書

口腔細菌とベーチェット病発症の関係性に関する研究

研究分担者 北市伸義 北海道医療大学 予防医療科学センター 教授
研究分担者 長澤敏行 北海道医療大学 歯学部 教授

研究要旨：

ベーチェット病は口腔内アフタ性潰瘍，眼のぶどう膜炎，皮膚症状，外陰部潰瘍を4大主症状とする難治性炎症性全身疾患である．ベーチェット病の原因は未だ不明のままであるが，これまでの研究により遺伝要因と環境要因が疾患発症に関連していると考えられている．

本研究ではベーチェット病発症に先行し，ほぼ全例で口腔粘膜のアフタ性潰瘍が発症することに注目し，その環境要因解明のため次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析によって口腔細菌叢を調査し，疾患の原因を解明することを目的とする．

ベーチェット病，サルコイドーシス，Vogt-小柳-原田病の患者および健常者，計100名の唾液を採取し，採取した唾液からDNAを抽出し，16s rRNAのV3-V4領域をPCRにて増幅し，そのアンプリコンをもとに次世代シーケンスを行った．得られたデータを基にサンプル内菌種多様性，サンプル間の相関関係（主座標解析PCoA）および階層毎の菌種組成（Taxonomyプロット）を解析した．

PCoA解析では，各疾患群とも異なったクラスターを形成していたことから，さらに被験者数を増やし詳細な細菌叢解析を行うと共に，患者の口腔内の状態も把握することが必要であると考えられる．

A．研究目的

ベーチェット病は，1937年トルコのベーチェットによって提唱された疾患で，多臓器侵襲性の難治性の病気である．口腔粘膜のアフタ性潰瘍，眼のぶどう膜炎，皮膚症状，外陰部潰瘍を主症状とし，急性炎症性発作を繰り返すことを特徴とする．地域的な分布を見てみると，世界的にはシルクロードに沿った帯状の地域に分布を示す．本症での失明率は高く，20歳代後半から40歳代にかけての働き盛りに発病が多い．腸管型や血管型，神経型などの特殊型ベーチェット病での死亡例が少なからずみられる．

病因は未だ不明であるが，疾患の発症には遺伝要因と環境要因（外因）の双方が重要であると考えられている．ベーチェット病ではHLA-B51の陽性率が高く，発病にHLA-B51そのもの，あるいはこれに連鎖する素因の役割が重視されている．2010年，日本およびトルコ・米国共

同研究チームが全ゲノム解析 (GWAS) により *IL23R/IL12RB2*, *IL10*が疾患感受性遺伝子であることが報告され, また, *IL-10*の産生不全による炎症制御低下がベーチェット病の炎症増幅につながっている可能性を示している. その後, さらに詳細な解析が加わり, *ERAP1*, *CCR1*, *STAT4*, *KLRC4*, *TLR4*, *NOD2*, *MEFV*などの疾患感受性遺伝子が次々と同定され, いずれも免疫応答や炎症に関わる分子をコードしていることが確認されている.

一方, 発症には外因も重要で, 遺伝要因に病原微生物をはじめとした外因が関わり, 自己免疫異常や好中球機能過剰をはじめとした自然免疫系の異常を引き起こし, 発症にいたると考えられている. 微生物の認識に関わる *TLR4*, *NOD2*やNK細胞受容体である *KLRC4*が疾患感受性遺伝子として同定されたことも, 疾患への微生物の関与を指示する所見である. 抜歯や扁桃炎があるとしばしば症状の増悪をみることがあることから, 口腔細菌の状態が病気に関わっているのではないかと考えられ, 特にプラークの初期付着に関与している連鎖球菌 *Streptococcus sanguinis*の役割が注目されてきたが, 調査対象数や口腔細菌の培養方法などに問題点があり, 特定の原因の同定には至っていない (Kaneko F et al. Eur J Dermatol 2008; Kurauchi K. et al. FEMS Immunol Med Microbiol 2005). おそらく単純な遺伝疾患や感染症ではなく, 遺伝要因と環境要因の両者の相互作用が病気の成り立ちに重要と考えられる.

近年, 口腔細菌の形成するバイオフィルム (プラーク) によって肺炎, 心疾患, 糖尿病, 高血圧など種々の基礎疾患が増悪することが報告されているが (de Melo Neto JP et al., 2013; Flores MF et al., 2013; Pralhad S et al., 2013), 口腔細菌による基礎疾病の増悪についての報告がある一方で, ベーチェット病などの眼疾患に係る報告は非常に少ない.

本研究ではベーチェット病発症に先行し, ほぼ全例で口腔粘膜のアフタ性潰瘍が発症することに注目し, その環境要因解明のため次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析によって口腔細菌叢を調査し, 疾患の原因解明, 将来的には予防および適切な治療法開発に結びつけることを目的とする.

B. 研究方法

1. 健常者とベーチェット病患者の唾液採取

本研究にともなう被験者の侵襲はなく, 事前に北海道医療大学の倫理委員会の承認を得た (北海道医療大学予防医療科学センター倫理委員会承認 第2015-010号). 口腔細菌の検体採取にあたっては, その目的と方法について被験者からの同意と協力を得た. 口腔細菌叢の細菌量は食事摂取・飲水・ブラッシングなどの外的要因に大きく影響されるため, 本研究での検体採取は食後2時間程度の時間帯とした. 唾液採取は, 健常者・患者唾液検体を採取した.

2. 唾液から細菌DNAの抽出

以前の報告では採取後培養された口腔細菌の量的違いが検討されているが, 培養による

バイアス（検体採取から培養開始までの時間や保存状態などの影響）を避けるため細菌DNAを用いた．唾液DNA抽出専用チューブ（OMNIGene・ORAL）に採取した．検体はDNA抽出キットDNeasy® Blood & Tissue Kit（QIAGEN）を用いてDNAを抽出した．

3. 口腔細菌叢のメタゲノム解析

16s rRNAのV3-V4領域をPCRにて増幅し，そのアンプリコンをもとに次世代シーケンスを行った（MiSeq, Illumina）．得られたデータを基にサンプル内菌種多様性，サンプル間の相関関係（主座標解析PCoA）および階層毎の菌種組成（Taxonomyプロット）を解析した．

4. 統計学分析

OTU（細菌種の数）およびShannon indexの比較には，Kruskal-Wallis検定による分散分析で有意差を認めたものに対して，Steel-Dwass法による多重検定を行った． $p < 0.05$ を有意差ありとした．

C. 研究結果

1. ベーチェット病患者27名，サルコイドーシス患者26名，Vogt-小柳-原田病患者17名および健常者30名から唾液の採取を行った．
2. ベーチェット病患者，サルコイドーシス患者，Vogt-小柳-原田病患者および健常者の唾液細菌叢を構成する細菌種数は，やや健常者のOTU（細菌種の数）の上昇を認めたが，すべての群間の細菌種の数に統計学的な有意差は認められなかった（図1）．
3. 多様性の指標であるShannon indexにおいても同様にすべての群間の細菌種の数に統計学的な有意差は認められなかった（図2）．
4. 続いて行ったPCoA解析では，各群とも異なったクラスターを形成していた（図3）．
5. 属レベルでの細菌種構成は，すべての群ともに *Veillonella*, *Streptococcus*, *Prevotella* が多く，属レベルでの大きな差は認められなかった（図4-7）．

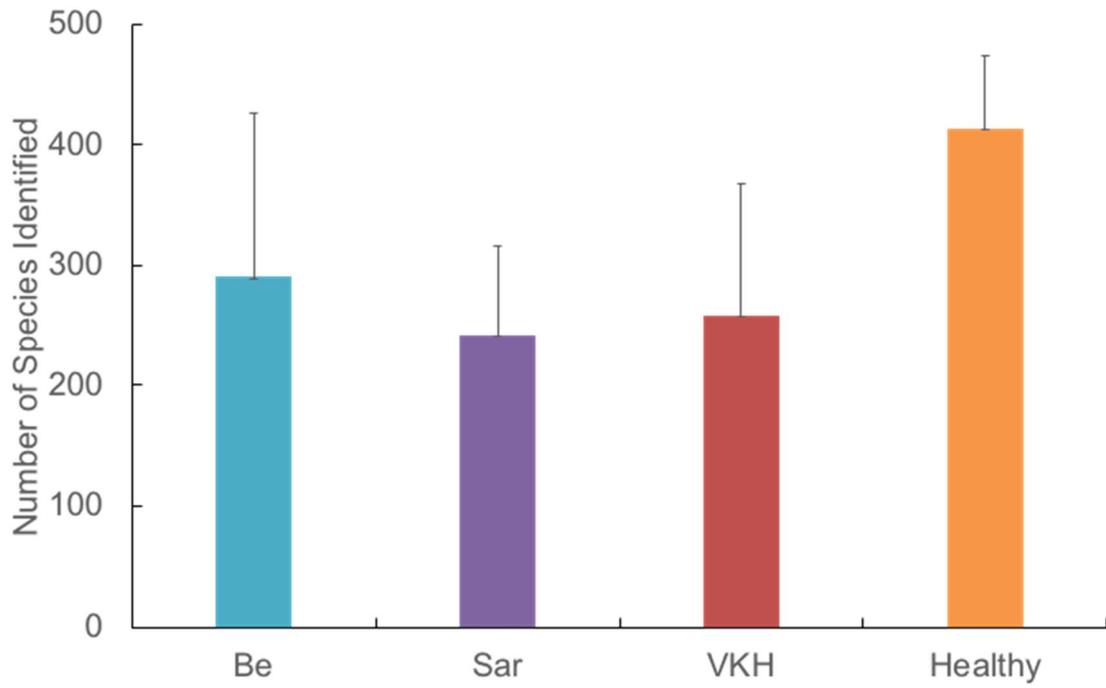


図1 OTU (Operational Taxonomic Unit) 解析

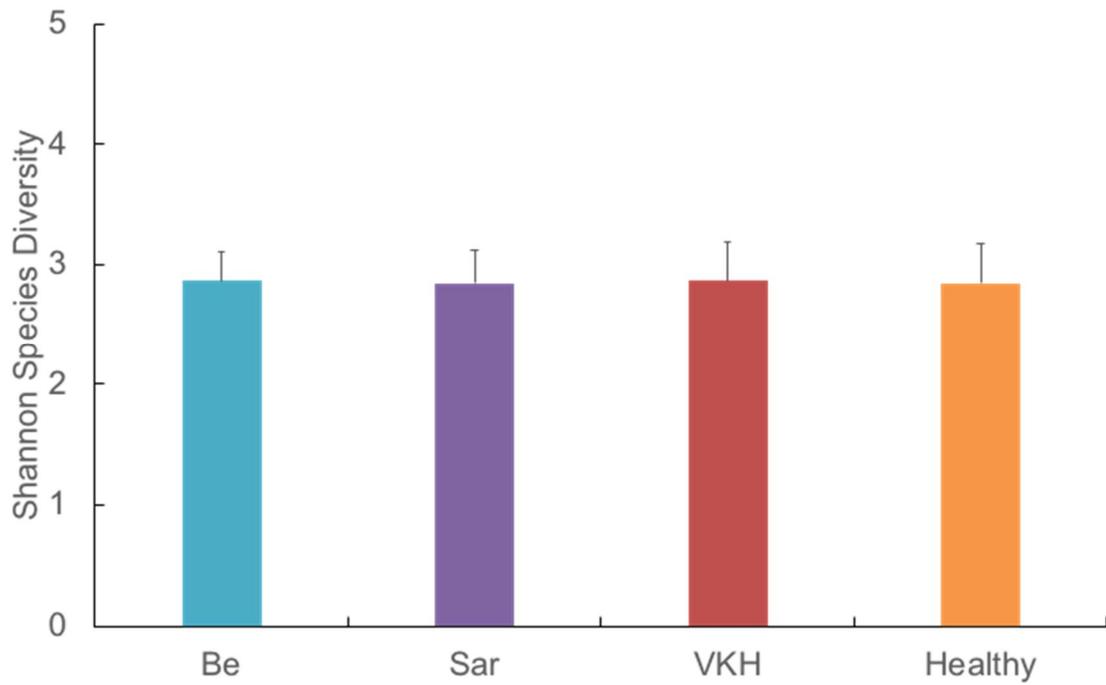


図2 Shannon index

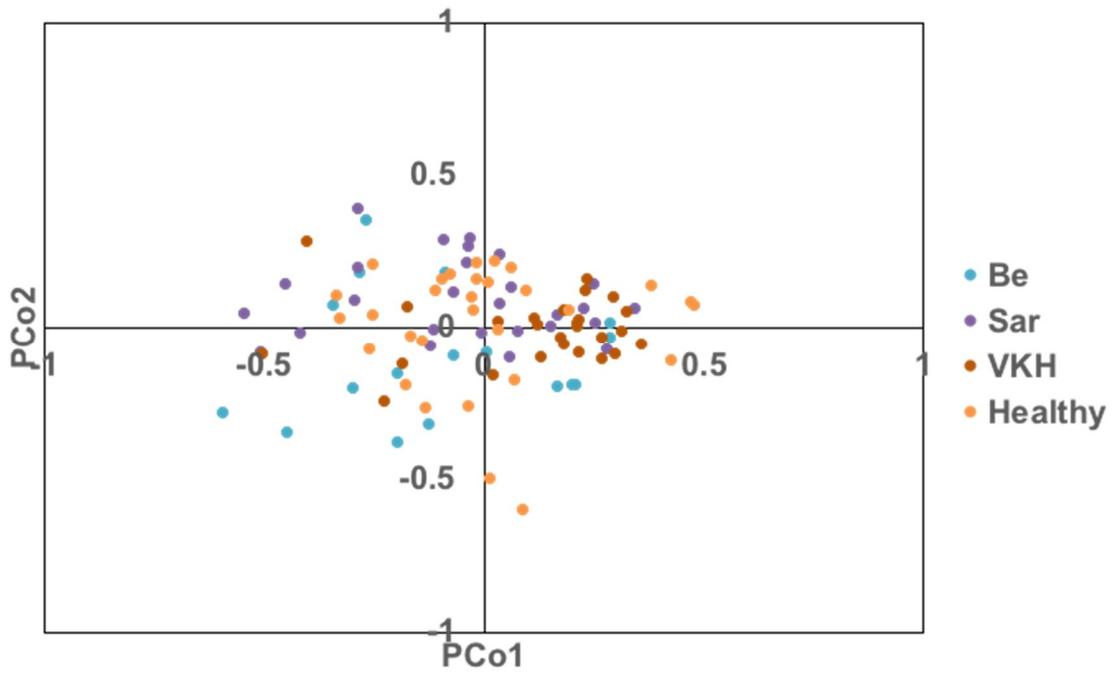


図3 PCoA (Principle Coordinates Analysis : 主座標分析)

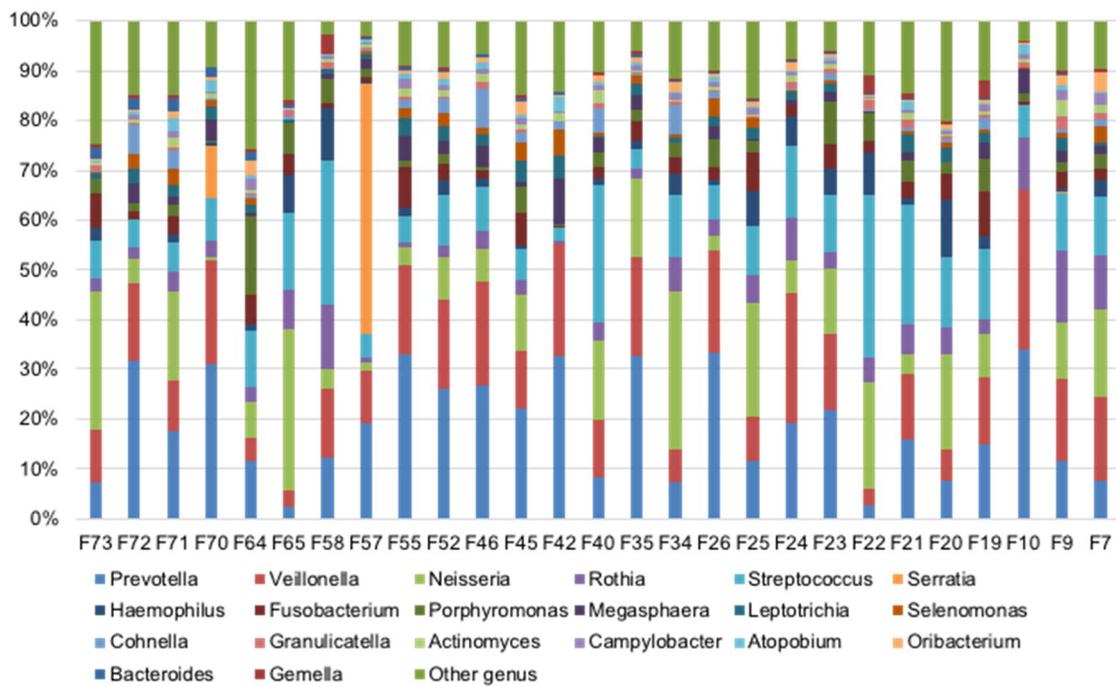


図4 ベーチェット病患者の唾液細菌叢

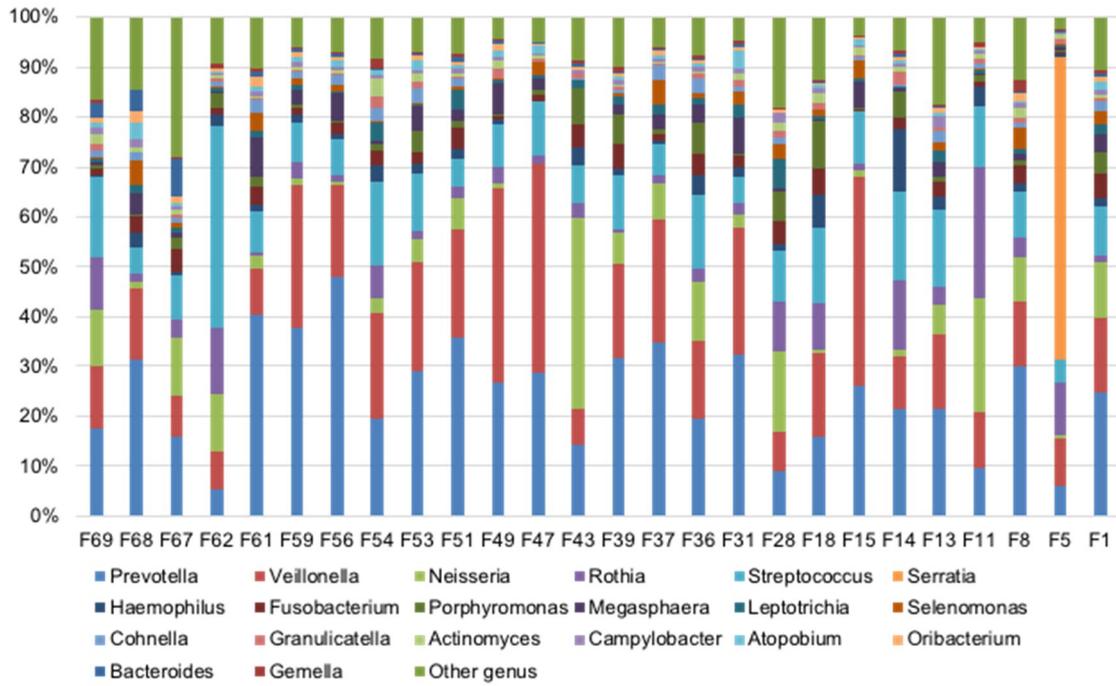


図5 サルコイドーシス患者の唾液細菌叢

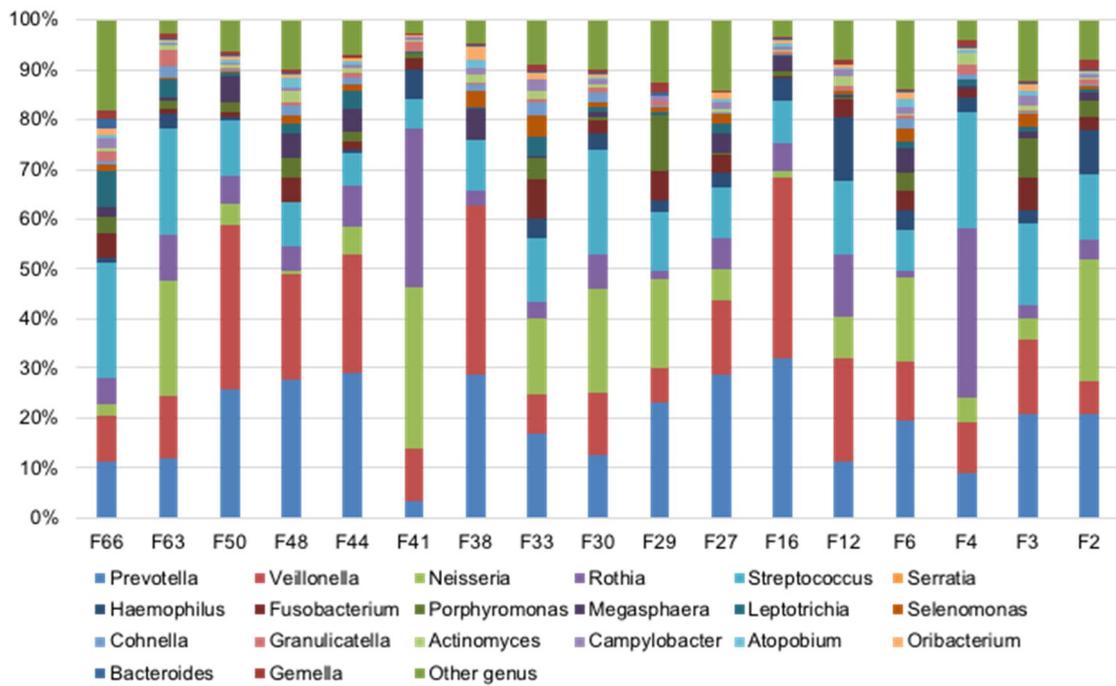


図6 Vogt-小柳-原田病患者の唾液細菌叢

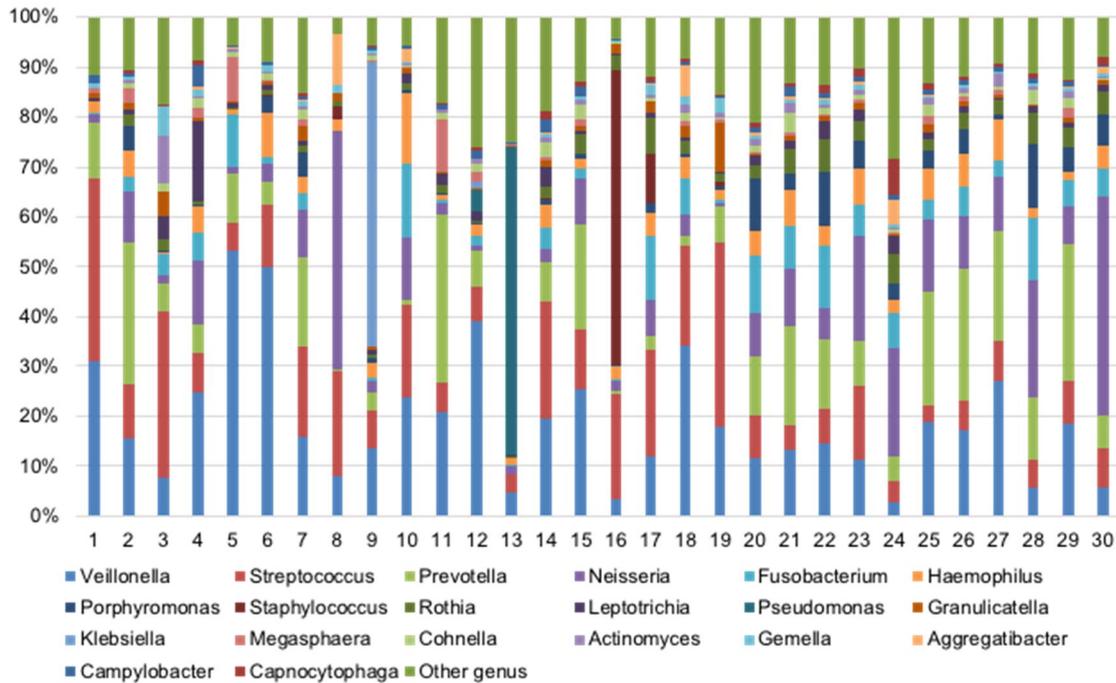


図7 健康者の唾液細菌叢

D . 考察

これまでの報告では、健康な成人の口腔内には、*Streptococcus*、*Haemophilus*、*Neisseria*、*Prevotella*、*Veillonella*、*Rothia*属の順に多い報告 (Bik EM et al., 2010)、また、健康者と比較して口腔潰瘍を有するベーチェット病患者には*Bifidobacterium concisus*、*Prevotella histicola*、*Clostridiales*および*Neisseria*種を含む細菌量に有意差があることが報告されている (Seoudi N et al., 2015)。本研究では、計100名の唾液を採取することができ、各群共に前述した報告のある細菌が多く含まれていた。PCoA解析では、各疾患群とも異なったクラスターを形成していたことから、さらに被験者数を増やし詳細な細菌叢解析を行うと共に、口腔内の状態を把握することが必要である。

今後、ベーチェット病における外因としての口腔細菌の具体的な関与について解明する必要がある、その解明は治療のみならず、予防にもつながる可能性がある。疾患の環境的発症要因があきらかになり、ベーチェット病高リスク患者においては発症前から歯科治療による事前介入あるいは疾患予防に貢献できる可能性がある。国民の健康にも医療経済的にも大きな意義を持つ重要なプロジェクトになると考えられる。

E . 結論

PCoA解析では、各疾患群とも異なったクラスターを形成することが示唆された。

F . 健康危険情報

(総括研究報告書において記載)

G. 研究発表

1. 論文発表

(総括研究報告書において記載)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし