

## 口腔微生物のアセトアルデヒド産生に関する研究

森谷, 圭介

---

<https://doi.org/10.15017/1500615>

---

出版情報：九州大学, 2014, 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

# 口腔微生物のアセトアルデヒド産生に関する研究

2014 年

森 谷 圭 介

九州大学大学院歯学府 口腔保健推進学講座

口腔予防医学分野

指導教員 山 下 喜 久 教授

## 対象論文

本論文は 2014 年 12 月 5 日現在、学術雑誌“Oral Diseases”に投稿中である。

"Acetaldehyde production by major oral microbes"

Keisuke Moritani, Toru Takeshita, Yukie Shibata, Toshiharu Ninomiya, Yutaka Kiyohara,  
Yoshihisa Yamashita

## 目 次

要旨	1
背景	3
材料及び方法	5
1. 唾液細菌叢の解析	
i) 調査対象	
ii) 唾液からの DNA 抽出	
iii) Barcoded pyrosequencing 法による解析	
2. 口腔細菌による ACH 產生能の評価	
i) 菌体の準備	
ii) ACH 產生能の測定	
iii) 糖および糖アルコールによる ACH 產生阻害実験	
iv) 唾液による ACH 產生に対するキシリトールの阻害効果	
結果	12
1. 口腔健常者唾液中の細菌構成	
2. 唾液中に優勢あるいは広汎に存在する口腔細菌の ACH 產生能	
3. <i>Candida</i> 属および <i>Neisseria</i> 属の ACH 產生能	
4. 口腔病原細菌およびその他の口腔細菌の ACH 產生能	
5. 糖および糖アルコールによる細菌の ACH 產生への阻害効果	
6. ヒト唾液による ACH 產生に対するキシリトールの阻害効果	
考察	27
総括	31
謝辞	32
参考文献	33

## 要　旨

目的：エタノールから発がん性物質であるアセトアルデヒド（ACH）を產生する微生物が口腔内に生息することが報告されており、口腔微生物が產生する ACH は上部気道消化管がんのリスクの一つと考えられている。しかし、口腔微生物の ACH 產生能については一部の細菌種について調べた報告があるのみで、広範囲の口腔細菌種の ACH 產生能を調べた報告はない。そこで本研究では、口腔健常者の唾液細菌叢に優勢あるいは広汎に存在する細菌種を明らかにし、それらの ACH 產生能を測定した。さらに、糖および糖アルコールによる ACH 高產生菌種の ACH 產生能に対する阻害効果を調べた。

材料および方法：16S rRNA 遺伝子のバーコードパイロシークエンス解析により 166 名の口腔健常者の唾液細菌叢の細菌種構成を決定した。微生物種の ACH 產生能はエタノールおよびグルコースを基質とし、Sensor Gas Chromatograph にて測定した。さらに、4 種類の糖と 5 種類の糖アルコールによる ACH 高產生菌種の ACH 產生能に対する阻害効果を調べた。

結果：口腔健常者の唾液細菌叢を解析したところ、以下の 3 条件のいずれかを満たす細菌種は 16 属 41 種であった；①平均構成比率が 1% を超える、②構成比率が 5% を超える被験者が存在する、③95% 以上の被験者に存在する。これらの細菌種の中で、分離培養され正式な学術菌種名が命名されており入手可能な菌種について ACH 產生能を測定したところ、*Neisseria* の 3 菌種はいずれも、エタノールを基質として高い ACH 產生能を示した。これらの 3 菌種に次いで、*Rothia mucilaginosa*、*Streptococcus mitis* および *Prevotella histicola* も高い ACH 產生能を示した。次に、ACH 高產生菌種の ACH 產生能に対する糖および糖アルコールによる阻害効果を調べた。糖に比べて糖アルコールの阻害効果が高く、中でもソルビトールとキシリトールの阻害率は 90% 以上であった。一方、30 分間糖アルコールに菌体を

暴露後に糖アルコールを洗浄・除去した場合には、いずれの糖アルコールも ACH 産生に対する阻害効果が著しく減じた。

結論：口腔健常者の唾液細菌叢には、高い ACH 産生能を有する細菌が数種類存在することが明らかとなり、口腔内での ACH 産生に口腔内細菌が関与していることが示唆された。また、糖アルコールは一過性ではあるがこれらの ACH 産生を抑制することが確認できた。

## 背 景

慢性的なアルコール摂取が口腔、咽頭、喉頭および食道を含む上部気道消化管 (UAT) がんの重要な危険因子であることは、多くの疫学研究により明らかになっている [1-3]。エタノール自体には発がん性はないので、アルコール摂取が UAT がんのリスクを増加させる決定的なメカニズムは未だ解明されていない。一方で、エタノールの最初の代謝産物であり、エタノールよりも強い発がん性を有するアセトアルデヒド (ACH) が、アルコール摂取による発がんリスクの増加に重要な役割を果たしていると考えられている。

ACH は強い毒性と変異原性をもっており、DNA のポイントミューテーションや DNA 付加体の形成を引き起こしたり、姉妹染色分体交換や染色体異常を誘発することが分かっている [4, 5]。近年、飲酒に伴って產生される ACH は、WHO の国際がん研究機関により、グループ 2B からより発がん性の高いグループ I として再分類された [6]。摂取されたエタノールは、主に肝臓のアルコールデヒドロゲナーゼにより ACH に酸化されるが、飲酒後ヒトの口腔内でもエタノールから ACH が產生されることが観察されている [7, 8]。加えて、唾液、含嗽液および気管支・肺の洗浄液をエタノールと共にインキュベーションすると ACH が產生されることが報告されている [9-11]。また、抗生素質や殺菌剤 (クロルヘキシジン) 使用後に ACH の產生が減少することから、エタノール摂取後の UAT における ACH 产生は、同部に生息する微生物によるエタノールの酸化によって生じていることが示唆された [7, 9]。さらに、不良な口腔衛生状態が UAT がんのリスク増加と関連するとの報告もある [12-14]。これらの結果は、口腔内の ACH 濃度の增加は主に口腔細菌叢に起因するという見解を支持している。

口腔に存在する *Candida* 属は *in vitro* においてエタノールおよびグルコースから ACH を

大量に産生し、口腔がんの発生に関与していることがすでに示されている [15-17]。しかしながら、正常な口腔フローラの大部分は細菌によって構成されており、*Candida* 属はごく一部でしかない。口腔には 700 種以上の細菌が存在しているにもかかわらず [18, 19]、その中で ACH 産生能が調べられているのは、*Neisseria* 属と *Streptococcus* 属のみである。両者ともエタノールからかなりの量の ACH を産生することが報告されている [20, 21]。エタノール摂取後の口腔内での ACH 産生に口腔細菌種がどの程度関わっているのかを知るために、口腔細菌叢を構成している個々の細菌種のエタノールからの ACH 産生能を知ることが重要である。また一方で、キシリトールが *Candida* 属の ACH 産生能を阻害することが報告されている [22]。このことは真菌のみならず、細菌による ACH 産生を制御する上で貴重な手掛かりであり、口腔細菌種の ACH 産生能に対するキシリトールの阻害効果を調べることは重要である。

本研究では、まず、口腔健常者の唾液細菌叢を構成する主要な細菌を 16S rRNA 遺伝子のバーコードバイロシーケンス解析法によって決定した。次に、主要口腔細菌がエタノールまたはグルコースから産生する ACH 量を評価した。加えて、糖や糖アルコールが ACH 高產生菌種の ACH 産生能にどの程度の阻害効果を示すかを検討した。

## 材料および方法

### 1. 唾液細菌叢の解析

#### i) 調査対象

本研究では、2007年6月から10月の間、久山町における全町民健診（久山コホート研究）にて歯科受診を希望または対象になった町民から唾液を採取した。唾液の採取方法は我々の以前の研究の方法にて採取した [23]。被験者は2分間ガムを咀嚼し続け、口腔内に唾液が溜まる度に、唾液回収用のプラスチックチューブに吐き出してもらった。被験者は唾液採取を行う前に歯科検診を受けた。そのうち、現在歯数が24歯以上、歯周ポケット深さ(PD)が4mm未満、アタッチメントロス(AL)が5mm未満、プロービング時の出血がない、未処置のままの齲歫がない、義歯の装着がない、の条件をすべて満たす40歳以上の者を口腔健常者と定義し、これに該当する166名（男性56名、女性110名、平均年齢 $53 \pm 9$ 歳）の唾液よりDNA抽出を行った。

この研究デザインとインフォームドコンセントを得るための手順については九州大学倫理委員会（参照番号：19B-1）からの承認を得た。すべての実験は、承認されたガイドラインに従って行った。すべての参加者に対して、この研究に関する内容を理解してもらうための説明を行った上で同意を得た。

#### ii) 唾液からのDNA抽出

唾液検体中に含まれるDNAの抽出は、Takeshita(2007)ら[24]の方法にて行った。500μlの唾液を20,400gで遠心分離し沈殿を得た後、200μlのlysis buffer(1% SDS溶液を加えた1mM EDTAを含む10mMトリス塩酸緩衝液; pH 8.0)に懸濁し、0.3g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°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、 $150\ \mu\text{l}$  の 1% SDS 溶液を加えて、70°Cにて 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およびフェノール・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った。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°Cにて凍結保存した。

### iii) Barcoded pyrosequencing 法による解析

口腔健常者 166 名の唾液中の細菌構成はバーコードパイロシーケンス法を用いて解析を行った。解析方法は過去の文献に記載した通りに行った [25]。166 名の口腔健常者の DNA 検体は、それぞれ 454 Life Sciences adapter A 配列と被験者ごとに異なる 10 塩基のバーコード配列を附加した 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 領域の網羅的增幅を行った。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)。 $1\ \mu\text{l}$  の鑄型 DNA ( $100\text{--}500\ \text{ng}/\mu\text{l}$  になるよう希釈したもの) に  $5\ \mu\text{l}$  の KOD DNA ポリメラーゼ、 $10\times$  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、 $100\ \mu\text{g}$  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) 、 $5\ \mu\text{l}$  の 2 mM dNTPs、 $2\ \mu\text{l}$  の 25 mM 塩化マグネシウム、各  $0.5\ \mu\text{l}$  の  $1\ \mu\text{M}$  両プライマー、 $1\ \mu\text{l}$  の KOD DNA ポリメラーゼ ( $2.5\ \text{U}/\mu\text{l}$ ) を加えた後、滅菌蒸留水を加えて総量を  $50\ \mu\text{l}$  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で 15 秒、60°Cで 20 秒、72°Cで 30 秒という反応を 30 サイクル行った。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、その他の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。塩基配列データは、240 塩基より短いもの、平均クオリティスコアが 25 未満であるもの、正しいフォワードプライマー配列を含んでいなかったもの、7 塩基以上のホモポリマーを含むもの、または N を含むものは、分析から除外した。以上のクオリティチェックを通過した配列は、10 塩基のバーコード配列に従って、各被験者毎のサンプルとして割り振った。BLAST を使用して、ヒト口腔マイクロバイオームデータベース (HOMD) の 831 口腔細菌の 16S rRNA 遺伝子配列 (HOMD 16S rRNA RefSeq version 13.2) の中から 98%以上の相同性を示したうえで最も相同性の高い細菌種の配列を検索した [26]。

## 2. 口腔細菌による ACH 產生能の評価

### i) 菌体の準備

本研究で使用した菌株を Table 1 に示す。菌株は ATCC (American Type of Culture Collection)、JCM (Japan Collection of Microorganisms)、TIMM (Teikyo University Institute of Medical Mycology) などから入手した。これらの菌株は、適当な培地と培養条件を用いて培

養し、すべて実験使用前に増殖曲線を作成した。

菌株は対数増殖期の中期の時点で集菌した。菌体を 0.2 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 1 回洗浄した後、PBS で再び懸濁して 492 nm での吸光度が 0.35 になるように調整した。

Table 1 Strains used in this study

Strains
<b>Fungal strains</b>
<i>Candida albicans</i> TIMM 5500
<i>Candida glabrata</i> TIMM 5512
<i>Candida guilliermondii</i> TIMM 0259
<i>Candida kefyr</i> TIMM 0298
<i>Candida krusei</i> TIMM 3378
<i>Candida parapsilosis</i> TIMM 5567
<i>Candida tropicalis</i> TIMM 0313
<b>Bacterial strains</b>
<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC 51655
<i>Actinomyces odontolyticus</i> JCM 14871
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> Y4
<i>Campylobacter concisus</i> ATCC 33237
<i>Capnocytophaga gingivalis</i> ATCC 33624
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 10953
<i>Fusobacterium periodonticum</i> JCM 12991
<i>Gemella morbillorum</i> ATCC 27824
<i>Gemella sanguinis</i> ATCC 700632
<i>Granulicatella adiacens</i> ATCC 49175
<i>Haemophilus parainfluenzae</i> ATCC 33392
<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149
<i>Lautropia mirabilis</i> ATCC 51599
<i>Neisseria flava</i> ATCC 14221
<i>Neisseria flavescens</i> ATCC 13120
<i>Neisseria mucosa</i> ATCC 19695
<i>Neisseria sicca</i> ATCC 29256
<i>Neisseria subflava</i> ATCC 49275
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277
<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83
<i>Porphyromonas</i> sp. CW034
<i>Prevotella histicola</i> JCM 15637
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611
<i>Prevotella melaninogenica</i> JCM 6325
<i>Prevotella pallens</i> JCM 11140
<i>Rothia dentocariosa</i> ATCC 17931
<i>Rothia mucilaginosa</i> JCM 10910
<i>Solobacterium moorei</i> JCM 10645
<i>Streptococcus anginosus</i> FW73
<i>Streptococcus australis</i> ATCC 700641
<i>Streptococcus gordoni</i> ATCC 10558
<i>Streptococcus infantis</i> JCM 10157
<i>Streptococcus intermedius</i> ATCC 27335
<i>Streptococcus mitis</i> JCM 12971
<i>Streptococcus mutans</i> UA159
<i>Streptococcus oralis</i> ATCC 9811
<i>Streptococcus parasanguis</i> ATCC 15912
<i>Streptococcus salivarius</i> HHT
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556
<i>Streptococcus sobrinus</i> OMZ176
<i>Streptococcus tigurinus</i> ATCC 15914
<i>Tannerella forsythia</i> ATCC 43037
<i>Treponema denticola</i> ATCC 35404
<i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744
<i>Veillonella parvula</i> ATCC 10790
<i>Veillonella rogosae</i> JCM 15642

## ii) ACH 產生能の測定

ACH 產生能の測定は Nieminen ら [16] の方法に準じて行った。492 nm での吸光度が 0.35 になるように調整した菌懸濁液 400  $\mu\text{l}$  をガスクロマトグラフ用のバイアルに移した後、50  $\mu\text{l}$  の 110 mM エタノール (最終濃度 11 mM) あるいは 50  $\mu\text{l}$  の 1 M グルコース (最終濃度 100 mM) を添加し、直ちに密閉した。密閉したサンプルを 37°C で 30 分間反応させた後、バイアルの PTFE/シリコン隔膜を介して 50  $\mu\text{l}$  の 6 M 過塩素酸を加えて反応を停止した。次に、バイアルのヘッドスペースの気体を PTFE/シリコン隔膜を介して 5 ml 採取し、ガスクロマトグラフィー機器 (センサガスクロマトグラフ SGEA-P2, エフアイエス株式会社, 兵庫, 日本, [http://www.fisinc.co.jp/en/common/pdf/E\\_SGEA-P2.pdf](http://www.fisinc.co.jp/en/common/pdf/E_SGEA-P2.pdf)) を用いて ACH 濃度を測定した。

ネガティブコントロールとして、PCA を最初に菌懸濁液に添加し、その後エタノールあるいはグルコースを注入したサンプルについても上記の方法で ACH 濃度を測定した。ネガティブコントロールから得られた ACH 濃度をそれぞれの菌株の ACH 濃度から差し引いて、各サンプルの ACH 濃度とした。

## iii) 糖および糖アルコールによる ACH 產生阻害実験

阻害実験にはグルコース、キシロース、フルクトース、スクロースの計 4 種の糖とキシリトール、ソルビトール、マンニトール、エリスリトール、マルチトールの計 5 種の糖アルコールを用いた。菌懸濁液は前述のとおりに調製し、阻害実験は 2 種類の方法で行った。一方は、350  $\mu\text{l}$  の菌懸濁液をガスクロマトグラフ用のバイアルに移し、50  $\mu\text{l}$  の 110 mM エタノール (最終濃度 11 mM) および 50  $\mu\text{l}$  の糖または糖アルコール (最終濃度 100 mM) あるいは 50  $\mu\text{l}$  の蒸留水をバイアルに添加した後、直ちに密閉した。密閉したサンプルを 37°C

で 30 分間反応させた後、バイアルの PTFE/シリコン隔膜を介して  $50 \mu\text{l}$  の 6 M 過塩素酸を加えて反応を停止後に前述の通り ACH 濃度を測定した。もう一方は、一端菌体を糖アルコールに曝露して、洗浄後に上記の ACH 產生能の測定を行った。すなわち、 $350 \mu\text{l}$  の菌懸濁液と  $50 \mu\text{l}$  の糖アルコール (最終濃度 100 mM) あるいは  $50 \mu\text{l}$  の蒸留水を  $1.5 \text{ ml}$  のマイクロチューブに入れ、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分間静置後、遠心分離で上清を除去し、菌体を 2 回洗浄した。その後、 $400 \mu\text{l}$  の PBS で再度菌体を懸濁して測定用のバイアルに移した。続いて、 $50 \mu\text{l}$  の 110 mM エタノール (最終濃度 11 mM) を加え、直ちにバイアルを密閉した。密閉したサンプルを  $37^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させた後、バイアルの PTFE/シリコン隔膜を介して  $50 \mu\text{l}$  の 6 M 過塩素酸を加えて反応を停止した後に ACH 濃度を前述の通りに測定した。阻害率は、コントロールとして糖あるいは糖アルコールの代わりに蒸留水を加えて反応させたサンプルの ACH 濃度に対する比率として計算した。

#### iv) 唾液による ACH 產生に対するキシリトールの阻害効果

九州大学歯学府歯学研究院口腔予防医学分野の医局員 7 名より唾液を採取した。唾液の採取は次のように行った。最初にパラフィンワックスを 30 秒間噛んでもらい、この間に溜まった唾液は飲み込むように説明した。その後 5 分間パラフィンワックスを咀嚼させ、口腔内にたまつた唾液を唾液採取用のチューブに回収した。

$350 \mu\text{l}$  の唾液をガスクロマトグラフ用のバイアルに移し、 $50 \mu\text{l}$  の 110 mM エタノール (最終濃度 11 mM) と  $50 \mu\text{l}$  の蒸留水あるいは  $50 \mu\text{l}$  のキシリトール (最終濃度; 10 mM、50 mM、100 mM) を加えて、直ちに密閉した。密閉したサンプルを  $37^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させた後、バイアルの PTFE/シリコン隔膜を介して  $50 \mu\text{l}$  の 6 M 過塩素酸を加えて反応を停止した。ACH 濃度の測定は前述の通りに行った。

## 結 果

### 1. 口腔健常者唾液中の細菌構成

本研究における 801,432 リードのうち、674,236 リードは HOMD に登録されている 529 種の口腔細菌配列 (440 oral taxon) に割り付けられた。主要な菌属の構成比率を Table 2 に示す。*Streptococcus* 属が平均構成比率 22.91%と最も優勢に存在し、*Prevotella* 属 (10.22%)、*Neisseria* 属 (9.80%) がそれに続いた。529 種の口腔細菌配列 (440 oral taxon) のうち、16 属 41 種 (菌種名が確定していない 11 種を含む)が、下記の 3 つの基準のいずれかに該当し、口腔内に優勢あるいは広汎に存在する細菌として定義された；1) 平均構成比率が 1%を超える (Relative abundance mean)、2) 構成比率が 5%を超える被験者が存在する (Relative abundance maximum)、3) 95%以上の被験者に存在する (Prevalence) (Table 3)。

Table 2 Relative abundances of predominant bacterial genera in saliva of orally healthy subjects

Genera	Mean	Relative abundance (%)
		Range (Minimum – Maximum)
<i>Streptococcus</i>	22.91 ± 7.59	9.04 - 47.71
<i>Prevotella</i>	10.22 ± 6.69	1.03 - 30.86
<i>Neisseria</i>	9.80 ± 6.78	0.05 - 31.27
<i>Veillonella</i>	6.75 ± 3.23	1.40 - 19.28
<i>Haemophilus</i>	4.02 ± 3.39	0.14 - 24.83
<i>Gemella</i>	3.70 ± 1.87	0.05 - 11.94
<i>Fusobacterium</i>	3.44 ± 2.22	0.15 - 11.01
<i>Actinomyces</i>	3.29 ± 2.23	0.45 - 17.32
<i>Granulicatella</i>	3.23 ± 1.60	0.02 - 10.13
<i>Porphyromonas</i>	3.09 ± 2.67	0 - 12.72
<i>Terrahaemophilus</i>	2.58 ± 3.14	0 - 19.68
<i>Alloprevotella</i>	1.76 ± 1.57	0 - 10.40
<i>Leptotrichia</i>	1.57 ± 7.59	0.02 - 47.71
<i>Rothia</i>	1.06 ± 6.69	0.03 - 30.86

Table 3 Predominant and prevalent bacterial species in saliva of orally healthy subjects

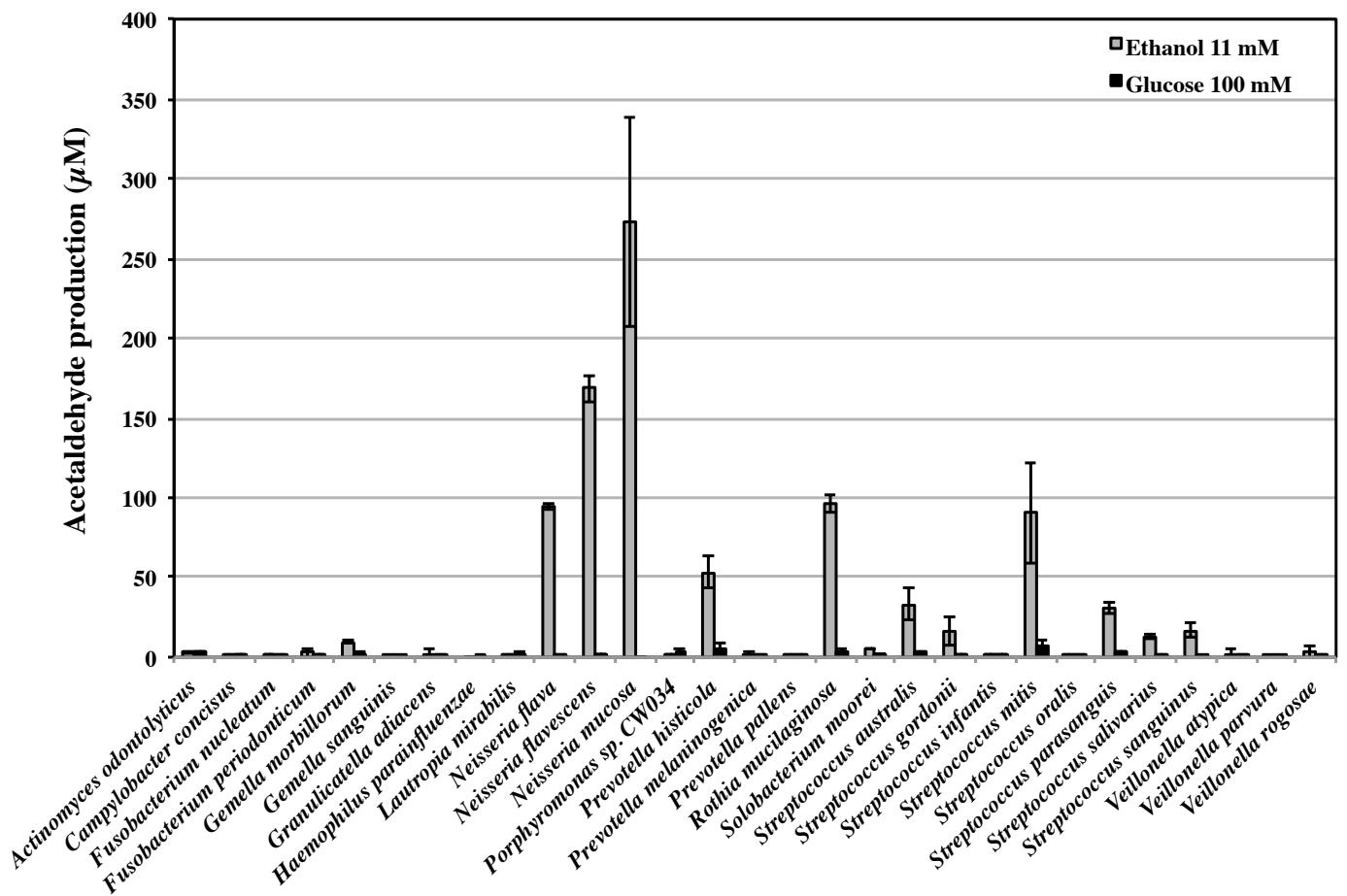
Bacterial species	Oral taxon ID	Relative abundance (%) Mean	Maximum	Prevalence (%)
<i>Neisseria flavescens</i>	610	8.4 ± 6.4	30.5	100
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	718, 826 <sup>a</sup>	6.4 ± 4.9	34.8	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	469	5.2 ± 3.7	20.3	100
<i>Streptococcus salivarius</i>	755	4.6 ± 4.4	20.2	98.2
<i>Streptococcus mitis</i>	677, 398 <sup>a</sup>	3.8 ± 3.1	19.1	100
<i>Granulicatella adiacens</i>	534	3.1 ± 1.6	10.1	100
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	201	2.8 ± 2.1	10.5	98.2
<i>Gemella sanguinis</i>	757	2.7 ± 1.5	10.0	99.4
<i>Veillonella parvula</i>	161	2.4 ± 2.1	12.6	100
<i>Porphyromonas</i> sp.	279	2.3 ± 2.2	12.3	95.2
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	411, 721 <sup>a</sup>	2.1 ± 2.3	13.5	97.0
<i>Veillonella rogosae</i>	158	1.9 ± 1.7	11.2	97.0
<i>Streptococcus</i> sp.	065	1.8 ± 1.9	12.4	98.8
<i>Veillonella atypica</i>	524	1.8 ± 1.6	9.3	100
<i>Prevotella pallens</i>	714	1.3 ± 1.4	7.5	95.8
<i>Streptococcus</i> sp.	061	1.2 ± 1.2	6.0	97.0
<i>Streptococcus australis</i>	073	1.1 ± 1.2	7.9	96.4
<i>Streptococcus infantis</i>	638	1.1 ± 1.7	14.3	100
<i>Prevotella</i> sp.	299	1.0 ± 1.2	10.3	95.8
<i>Prevotella histicola</i>	298	1.0 ± 2.1	14.6	76.5
<i>Streptococcus</i> sp.	431	1.0 ± 0.9	5.2	97.6
<i>Streptococcus</i> sp.	058	0.9 ± 1.2	10.5	92.8
<i>Streptococcus</i> sp.	064	0.9 ± 1.0	4.9	97.6
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	701	0.8 ± 0.7	4.2	98.2
<i>Rothia mucilaginosa</i>	681	0.7 ± 0.7	5.2	99.4
<i>Actinomyces</i> sp.	180	0.7 ± 0.8	5.8	90.4
<i>Actinomyces graevenitzii</i>	866	0.7 ± 0.9	6.7	95.8
<i>Streptococcus sanguinis</i>	758	0.6 ± 0.7	4.9	100
<i>Gemella morbillorum</i>	046	0.6 ± 0.7	6.5	94.6
<i>Actinomyces</i> sp.	172	0.6 ± 1.0	6.1	79.5
<i>Lautropia mirabilis</i>	022	0.6 ± 0.8	6.6	92.2
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	200, 202, 420, 698 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.5	2.6	98.8
<i>Solobacterium moorei</i>	678	0.5 ± 0.4	2.1	99.4
<i>Neisseria mucosa</i>	682	0.5 ± 1.0	7.6	56.0
<i>Leptotrichia</i> sp.	417	0.4 ± 0.7	6.0	85.5
<i>Streptococcus gordonii</i>	622	0.4 ± 0.6	5.5	86.1
<i>Streptococcus oralis</i>	707	0.3 ± 0.6	6.2	85.5
<i>Neisseria flava</i>	609	0.3 ± 0.8	7.3	45.2
<i>Prevotella</i> sp.	306	0.2 ± 0.9	10.5	48.8
<i>Campylobacter concisus</i>	575	0.2 ± 0.2	1.0	96.4
<i>Oribacterium sinus</i>	457	0.2 ± 0.2	0.9	97.6

<sup>a</sup>These oral taxons were identified as same bacterial species, therefore the relative abundances and prevalences were combined.

## 2. 唾液中に優勢あるいは広汎に存在する口腔細菌の ACH 産生能

口腔健常者の唾液中に優勢あるいは広汎に存在した 41 種の細菌種の中で、分離培養されて正式な学術菌種名が付与されていたのは 30 種であった。これら 30 種のうち、*Actinomyces graevenitzii* と *Oribacterium sinus* を除く 28 菌種と、我々の研究室でヒトの唾液から分離した *Porphyromonas* sp. (*Oral Clone CW034*) HOT\_279、合計 29 菌種の ACH 産生能を測定した。*A. graevenitzii* と *O. sinus* は ATCC、JCM および Microbiologics に保存されておらず、入手が困難であったため測定対象から除外した。

各菌種の ACH 産生濃度を Figure 1 に示す。11 mM エタノールの存在下で、*Neisseria* 属の 3 菌種 (*Neisseria mucosa*、*Neisseria flavescens*、*Neisseria flava*) はいずれも高い ACH 産生能を示した (それぞれ  $272.8 \pm 65.5 \mu\text{M}$ 、 $168.4 \pm 8.6 \mu\text{M}$ 、 $94.4 \pm 2.1 \mu\text{M}$ )。その中で、最も多く ACH を產生したのは *N. mucosa* であった。続いて、*Rothia mucilaginosa*、*Streptococcus mitis*、*Prevotella histicola* もそれぞれ  $95.9 \pm 5.9 \mu\text{M}$ 、 $90.2 \pm 31.3 \mu\text{M}$ 、 $53.2 \pm 10.1 \mu\text{M}$  の ACH を產生した。*Streptococcus* 属に関しては、*S. mitis* 以外の菌種も若干の ACH 產生が認められたが、 $50 \mu\text{M}$  以下であった。これら以外の細菌種はエタノールからの ACH 产生は認められなかつた。また、グルコース存在下では、いずれの細菌種も ACH の产生は認められなかつた。

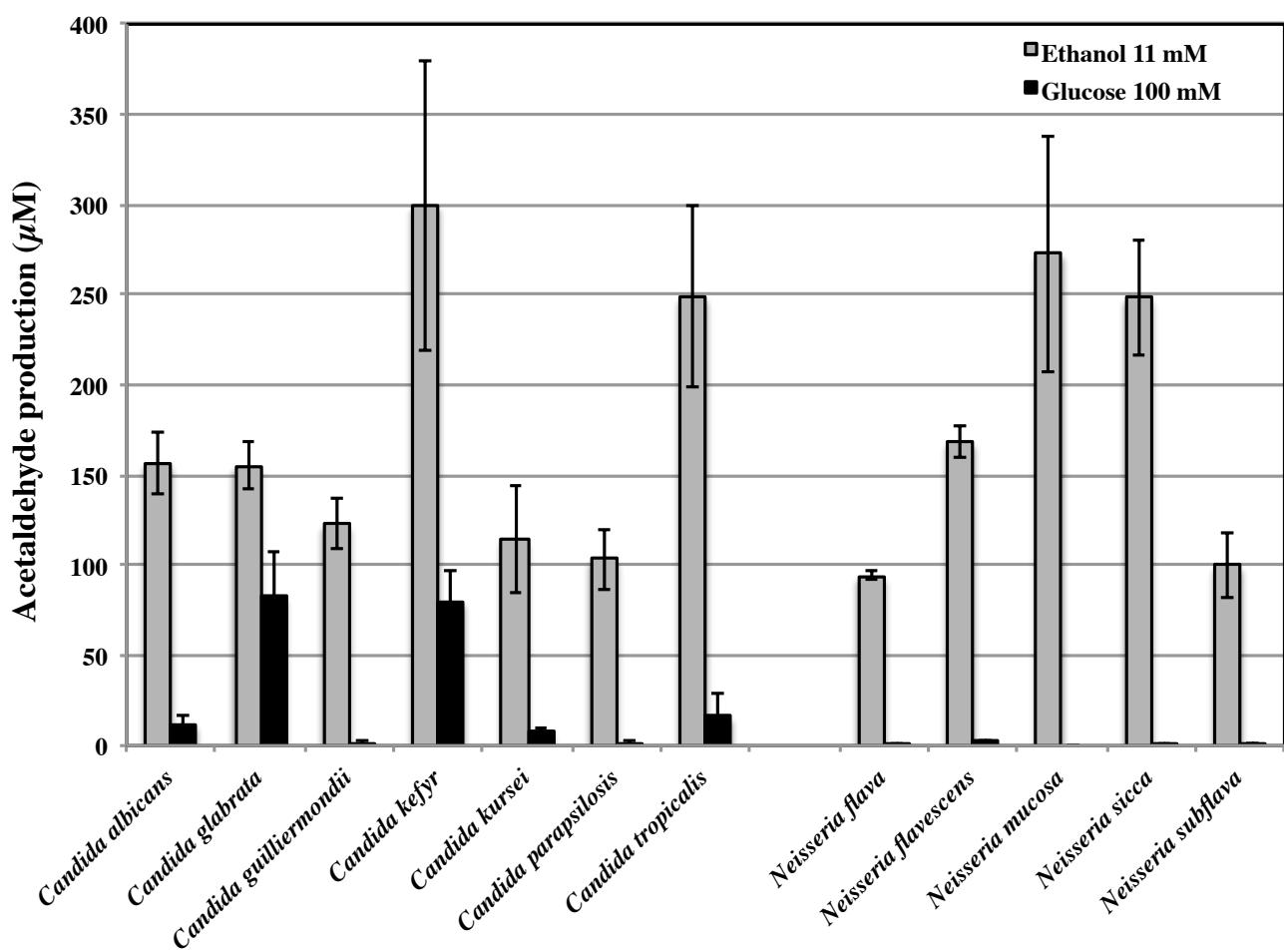


**Figure 1** Acetaldehyde production of predominant and prevalent bacteria in the saliva of orally healthy subjects in the presence of 11 mM ethanol and 100 mM glucose. The data represent the means  $\pm$  standard deviations of three and more independent experiments.

### 3. *Candida* 属および *Neisseria* 属の ACH 産生能

*Candida* 属および *Neisseria* 属がエタノール存在下で高い ACH 産生能を有することはすでに報告されている。本研究では 7 種の *Candida* 属と 5 種の *Neisseria* 属の ACH 産生量を調べた (Figure 2)。以前の報告に含まれていない *Candida kefyr* を含めすべての *Candida* 属はエタノール (最終濃度 11 mM) から高濃度の ACH ( $> 100 \mu\text{M}$ ) を産生した。以前の報告 [16] で最も高い産生能を示した *Candida tropicalis* ( $248.9 \pm 49.9 \mu\text{M}$ ) よりも *C. kefyr* のほうがより高濃度の ACH を産生した ( $299.3 \pm 80.9 \mu\text{M}$ )。また、*Neisseria* 属もすべて高い ACH 産生能が認められた ( $94.4 \pm 2.1 \mu\text{M}$  から  $272.8 \pm 65.5 \mu\text{M}$ )。*Neisseria* 属の中では、*N. mucosa* が最も高い ACH 産生能を有し、これは *C. tropicalis* と同等の産生能であった。これらの結果より、エタノール摂取後、口腔内では *Neisseria* 属が *Candida* 属とほぼ同等の ACH 産生能を発揮していることが確認された。

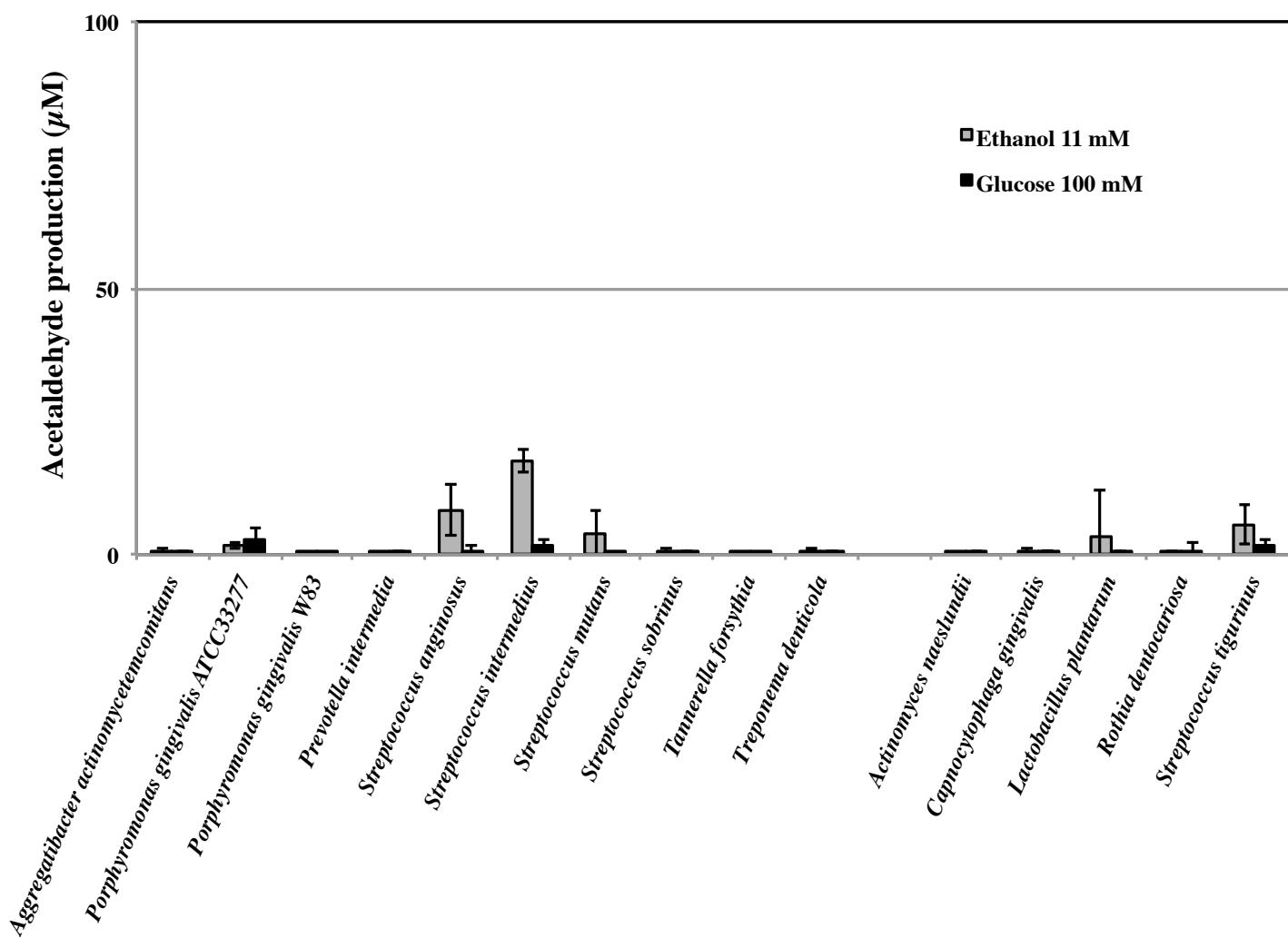
一方、グルコース (最終濃度 100 mM) 存在下では *Candida glabrata* と *C. kefyr* がかなりの ACH を産生した (それぞれ  $83.1 \pm 24.8 \mu\text{M}$  と  $80.1 \pm 16.8 \mu\text{M}$ )。その他の *Candida* 属菌種のグルコースからの ACH 産生は僅かであった ( $< 50 \mu\text{M}$ )。対照的に、*Neisseria* 属はどの菌種もグルコースから ACH を産生しなかった。



**Figure 2** Acetaldehyde production of *Neisseria* species and *Candida* species in the presence of 11 mM ethanol and 100 mM glucose. The data represent the means  $\pm$  standard deviations of three and more independent experiments.

#### 4. 口腔病原細菌およびその他の口腔細菌の ACH 産生能

唾液中の主要な細菌に加えて、今回、*Porphyromonas gingivalis*、*Tannerella forsythia*、*Treponema denticola*、*Prevotera intermedia*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Streptococcus anginosus*、*Streptococcus intermedius*、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus sobrinus*など口腔病原性細菌についても ACH 産生能を調べた。いずれもエタノールおよびグルコースからの ACH 産生は極めて低濃度であった (Figure 3)。さらにその他、口腔に存在する *Actinomyces naeslundii*、*Capnocytophaga gingivalis*、*Lactobacillus plantarum*、*Rothia dentocariosa*、*Streptococcus tigurinus*についても ACH 産生能を調べたが、同様の結果であった (Figure 3)。



**Figure 3** Acetaldehyde production of oral pathogenic bacteria and other bacteria in the presence of 11 mM ethanol and 100 mM glucose. The data represent the means  $\pm$  standard deviations of three and more independent experiments.

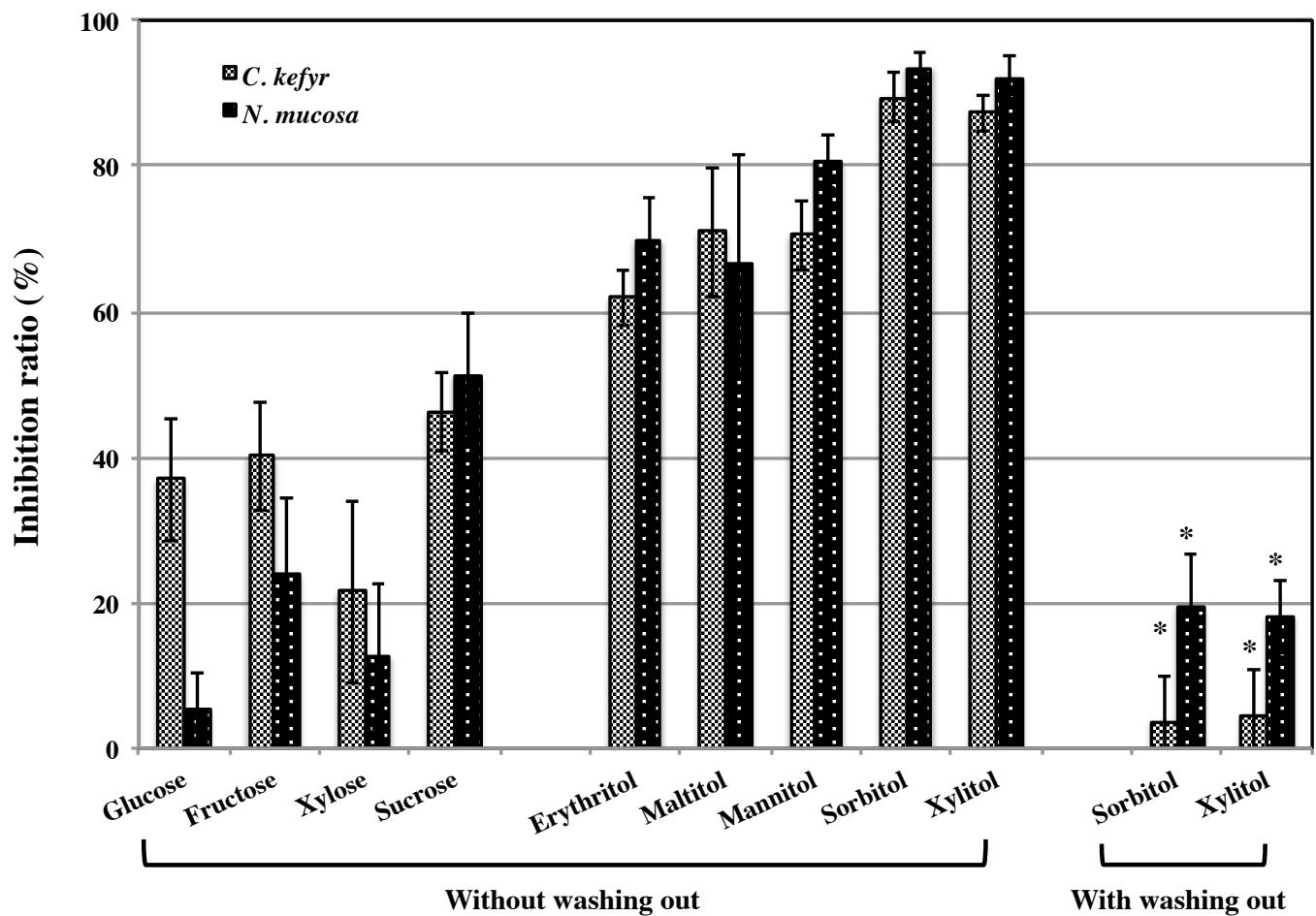
## 5. 糖および糖アルコールによる細菌の ACH 産生への阻害効果

キシリトールが *Candida* 属の ACH 産生を阻害することはすでに報告されており、本研究では、細菌の ACH 産生に対してもキシリトールが阻害効果を示すかどうかを検討した。阻害実験には、口腔細菌の中で最も ACH 産生能の高かった *N. mucosa* と、比較対象として真菌の中で ACH を最も多く産生した *C. kefyr* を使用した。まず、キシリトール以外にも阻害効果のある糖あるいは糖アルコールが存在するか否かを調べるために、4 種類の糖と 5 種類の糖アルコールについて阻害効果を調べた。菌懸濁液に基質であるエタノールと糖を加えて 37°Cで 30 分間反応させたところ、Figure 4 に示すように *C. kefyr* および *N. mucosa* の ACH 産生に対する糖の阻害率は約 50%あるいはそれ以下であった。スクロースは *C. kefyr* ならびに *N. mucosa* の ACH 産生に同様の阻害効果を示したが、その他の糖は *N. mucosa* よりも *C. kefyr* の ACH 産生を強く阻害した。一方、*C. kefyr* ならびに *N. mucosa* の ACH 産生に対する糖アルコールの阻害率は糖の阻害率よりも高く、*C. kefyr* および *N. mucosa* 両方に対して 60%以上の阻害率を示した。各糖アルコールの両菌種に対する阻害効果はほぼ同じであった。糖アルコールの中で最も高い阻害率を示したのは、ソルビトールとキシリトールであり、阻害率は、*C. kefyr* に対してはそれぞれ  $89.5 \pm 3.5\%$ 、 $85.1 \pm 4.8\%$ 、*N. mucosa* に対してはそれぞれ  $93.6 \pm 1.8\%$ 、 $92.2 \pm 3.1\%$  であった。

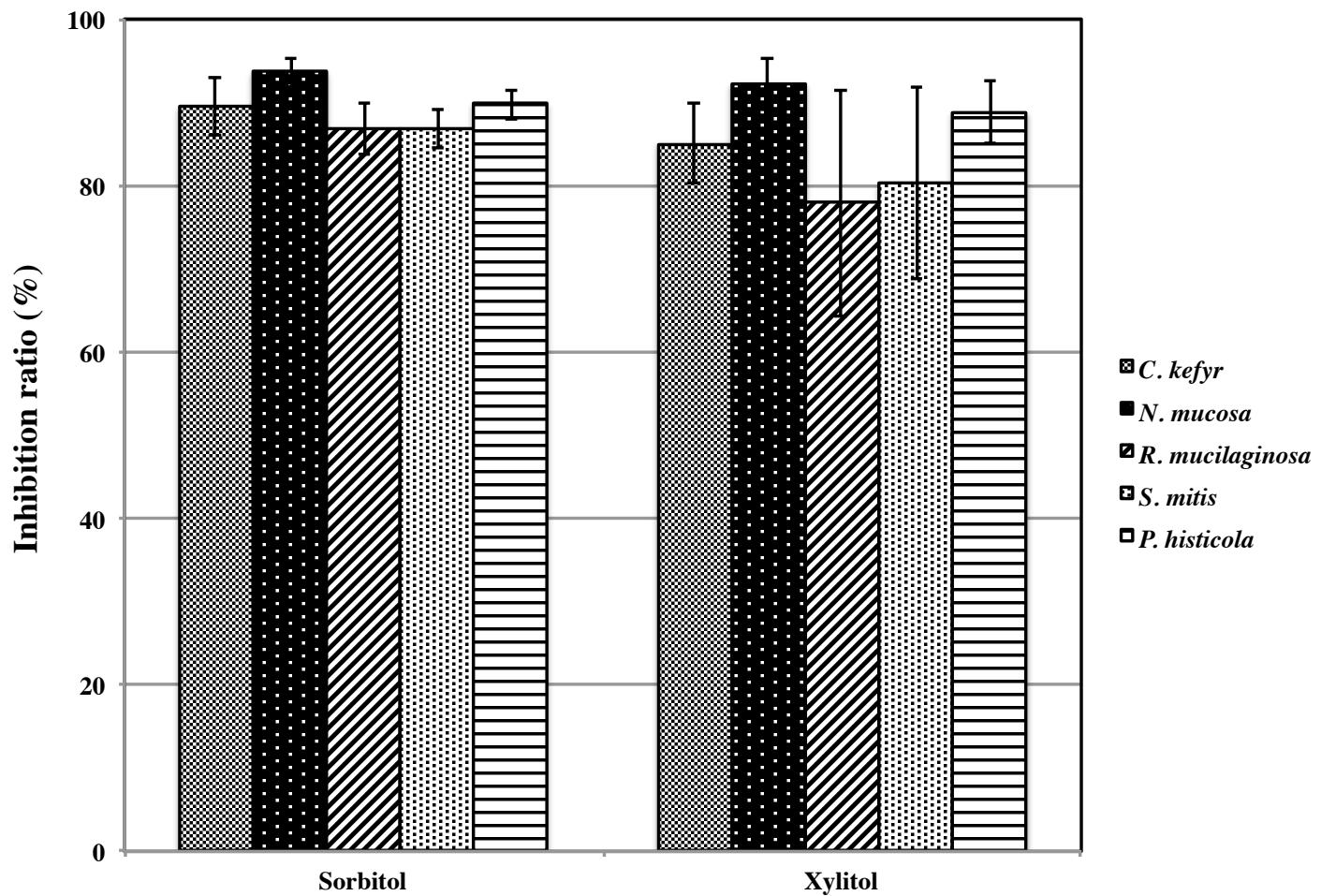
次に、ACH 産生を強く阻害するソルビトールとキシリトールを使用し、糖アルコールによる ACH 産生の阻害効果の持続性を検討した。菌懸濁液と糖アルコールをインキュベーションした後、糖アルコールを洗浄除去してからエタノールを添加した場合、ソルビトールにおいてもキシリトールにおいても阻害率が有意に低下し ( $p<0.001$ )、このような阻害効果の低下は *C. kefyr* ならびに *N. mucosa* の両菌種に対して認められた (Figure 4)。

さらに、今回新たに ACH の産生が認められた *S. mitis*、*R. mucilaginosa*、*P. histicola* に対

するソルビトールとキシリトールの影響を調べたところ、3 菌種すべての ACH 産生能に対して、糖アルコールによる強い阻害効果が認められた (Figure 5)。



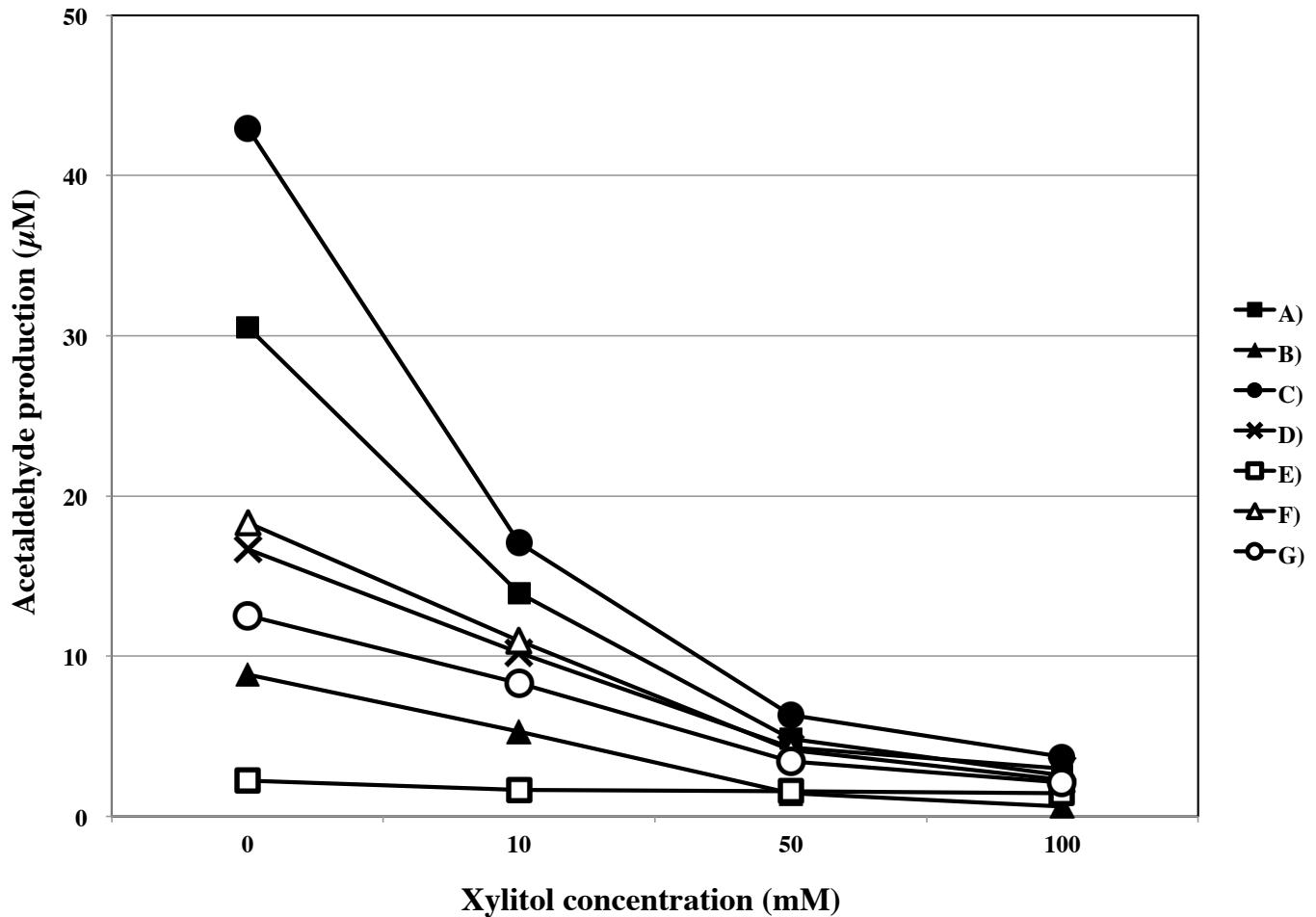
**Figure 4** Effect of sugars and sugar alcohols on acetaldehyde production of *C. kefir* and *N. mucosa* in the presence of 11 mM ethanol. The data represent the means  $\pm$  standard deviations of three and more independent experiments. Significant differences between inhibition ratio with and without washing out of sorbitol or xylitol were analysed using Student's *t*-test: \*,  $p < 0.001$ . Without washing out; sugar or sugar alcohol was added into the cell suspension together with ethanol, and then they were incubated. With washing out; sugar or sugar alcohol was washed out after pre-incubation of them with the cell suspension, and then the cell resuspension was incubated with ethanol.



**Figure 5** Effect of sorbitol and xylitol on acetaldehyde production of *C. kefyr*, *N. mucosa*, *R. mucilaginosa*, *S. mitis* and *P. histicola* in the presence of 11 mM ethanol. The data represent the means  $\pm$  standard deviations of three and more independent experiments.

## 6. ヒト唾液による ACH 産生に対するキシリトールの阻害効果

唾液をエタノールと一緒にインキュベーションすると ACH が産生されることはすでに報告されているので [7]、唾液を検体として用いた場合のキシリトールの阻害効果を検討した。唾液に濃度の異なるキシリトールとエタノールを加えてインキュベーションし、ACH 産生能を測定した結果を Figure 6 に示す。元来 ACH 産生能を有しなかった 1 人の唾液を除いて、キシリトールの添加は唾液による ACH 産生を阻害し、その効果は濃度依存的であった。キシリトール無添加で最も高い ACH 産生が認められた唾液では、 $100 \mu\text{M}$  のキシリトールの添加が ACH 産生を 91.3% 阻害する結果となった。しかしながら、この実験はそれぞれの被験者に対して 1 回しか実施されておらず、更なる実験が必要である。



**Figure 6** Effect of xylitol on acetaldehyde production in *saliva* containing 11 mM ethanol. Saliva collected from seven adults (A to G) was assessed their ACH production in the absence or presence of xylitol.

## 考 察

本研究では、口腔健常者の唾液中に存在する主要な 29 の細菌種について ACH 產生能を測定した。*Neisseria* 属は 3 菌種すべて、エタノールからかなりの量の ACH を產生し、続いて、*R. mucilaginosa*、*S. mitis*、*P. histicola* も ACH 產生能を有することがわかつた。*S. mitis* 以外の口腔連鎖球菌も ACH 產生能を示したが、上述の細菌種とは異なり、今回の測定条件では、変異原性を示すと報告されている濃度 (50-100  $\mu\text{M}$ ) [27] を超えるものではなかつた。11 mM というエタノール濃度は 0.05% (wt/vol) に相当する。一般的に、ウイスキー や ブランデーなどの蒸留酒のアルコール濃度は 30~90% で、ビールやワインのアルコール濃度は 5~15% である。過去の報告の中で、フッ化物洗口をして 15 分後に唾液中のフッ化物濃度を測定したところ、口に含んだフッ化物の 1.2% が残留していることが示されている [28]。この結果を考慮すると、一般的なアルコール摂取後に口腔内のエタノール濃度が 11 mM 以上に保たれる可能性はきわめて高いことがわかる。したがつて、11 mM というエタノール濃度を使用した今回の ACH 產生実験は日常的なアルコール摂取の際に口腔内で起こつている現象を反映していると思われる。これらの結果から、口腔細菌が日常的なアルコール摂取による口腔内での ACH 產生に重要な役割を果たしており、UAT がんの発症にも部分的ではあるが、関与している可能性が示唆された。

今回、口腔内に優勢あるいは広汎に存在する細菌として定義された *Neisseria* 属の 3 菌種 (*N. mucosa*、*N. flavescens*、*N. flava*) のすべてが、エタノールからの非常に高い ACH 產生能を有していた。さらに、口腔内の主要な菌種ではないが、他の *Neisseria* 属の 2 菌種 (*N. sicca*、*N. subflava*) も高い ACH 產生能を示した。これらの結果は *N. mucosa*、*N. sicca*、*N. subflava* が高い ACH 產生能をもつてゐるという過去の報告と一致し [20]、高い ACH 產生

能は *Neisseria* 属の特徴であることを示唆している。しかしながら、この結論を出すには上記以外の *Neisseria* 属菌種の ACH 產生能を評価しなければならない。一方、今回調べた *Streptococcus* 属の 13 菌種の ACH 產生能には大きなばらつきがあり、*S. mitis* のみが 50 μM 以上の ACH を產生した。同様に、*Rothia* 属では *R. mucilaginosa* のみが、*Prevotella* 属では *P. histicola* のみが 50 μM を超える ACH を產生した。これらの結果を考えると ACH 產生能は細菌を分類する上で有用なマーカーとなるかもしれない。

今回、*Candida* 属だけでなく、*Neisseria* 属においてもキシリトールにより ACH 產生能が強く阻害されることがわかった。キシリトール以外の他の糖アルコールについても同様の結果であった。加えて、キシリトールとソルビトールは *Neisseria* 属以外の細菌種の ACH 產生も阻害した。さらに、ヒト唾液を用いた *in vitro* での ACH 產生においても、キシリトールによる抑制効果がみられた。キシリトールやソルビトールは口腔細菌の酸產生のための基質とならないため、齲歯予防の目的でスクロースの代替糖としてチューイングガムやキャンディに使用されている。糖アルコールは過剰摂取により下痢を引き起こす可能性はあるが、一般的には安全であると考えられている。今後、唾液を用いた *in vitro* での阻害実験の回数を重ねること、さらに *in vivo* での口腔内 ACH 產生に対するキシリトールの阻害効果を検証することが必要であるが、本研究の結果より糖アルコールを含有するチューイングガムやキャンディが口腔微生物によるエタノールからの ACH 產生を抑制するのに有用であることが示唆された。

*Candida* 属および *Neisseria* 属の ACH 產生に対するソルビトールの阻害効果は、キシリトールに匹敵する。Uittamo ら [22] はキシリトールデヒドロゲナーゼがアルコールデヒドロゲナーゼファミリーに属することから、キシリトールはアルコールデヒドロゲナーゼの基質結合部位を妨害することによって、直接アルコールデヒドロゲナーゼ活性を阻害し

ているのであろうと報告した。ソルビトールデヒドロゲナーゼもまたアルコールデヒドロゲナーゼファミリーに属するので、ソルビトールによる ACH 産生阻害もキシリトールと同じメカニズムによって起こっていると考えられる。しかしながら、口腔微生物の ACH 産生に対する糖アルコールの阻害効果は一時的なものであり、エタノールと糖アルコールが一緒に存在する場合のみに限られている。したがって、より高い阻害効果を得るには、飲酒中の唾液の ACH を適当な濃度に維持する方法を工夫しなければならない。あるいは、糖アルコールの分子構造を改変して、アルコールデヒドロゲナーゼに強固に持続的に結合するような阻害物質を開発する必要がある。

本研究により、飲酒中における口腔内での ACH 産生に唾液中の細菌が重要な働きをしていることが明らかとなり、口腔内の細菌数全体を減少させることが ACH 産生の減少に繋がることが示唆された。この結果は不良な口腔衛生状態が慢性的な飲酒習慣と重なると、UAT がんの発症リスクになるという見解を支持するものである。一方で、本研究は唾液細菌叢を構成している細菌の中で、*Neisseria* 属のようないくつかの特定の細菌がエタノールから ACH を産生する能力をもっていることを示した。*Neisseria* 属の分布率は被験者間で 0.05～31.27% と非常に大きな違いがある。唾液中に *Neisseria* 属が多く存在することは飲酒時における口腔内での ACH 産生の増加に繋がるかもしれない。自分自身の唾液細菌叢の構成を知ることにより、特に飲酒習慣のある人にとっては、各個人の飲酒による UAT がんの発症リスクを自覚できるようになるであろう。*Neisseria* 属の分布率の高いことが必ずしも *Neisseria* 属の菌量が多いことにはならないが、口腔細菌の菌量をコントロールすれば、唾液中に *Neisseria* 属が優勢である人であっても ACH 産生を減少させることができるものである。このことは口腔清掃の不良が UAT がんの危険因子であるという疫学調査の結果と一致する。

一方、すべての真菌種がエタノールのみならず、グルコースからも ACH を産生する高い能力をもっている。口腔内の真菌量は年齢とともに増加し、特に義歯装着者では顕著である。したがって、高齢者における口腔内真菌量を十分な口腔ケアによってコントロールすることは、カンジダ症だけでなく UAT がんの予防にとっても重要なことと考えられる。

## 総 括

1. 今回口腔健常者の唾液から検出された細菌の中で、平均構成比率が 1 %を超える、構成比率が 5%を超える被験者が存在する、95%以上の被験者に存在するという 3 つの条件のいずれかに該当する細菌は 16 菌属 41 菌種であった。
2. 口腔健常者の唾液細菌叢には、高い ACH 産生能を有する細菌が数種類存在することが明らかとなり、口腔内での ACH 産生に口腔細菌が関与していることが示唆された。
3. 糖アルコールは真菌だけでなく口腔細菌の ACH 産生も阻害することが確認できた。

## 謝 辞

本研究を実施するにあたり、唾液細菌叢の解析のために口腔診査および唾液の採取に快く応じてくださいました福岡県糟屋郡久山町の住民の皆様に感謝の意を表します。

研究の方向性や内容に関し終始多大なご助言を頂きました口腔予防医学分野 山下喜久教授に感謝を申し上げるとともに、研究に関しての多大なるご指導、ご協力頂きました同分野 竹下徹准教授ならびに柴田幸江助教に心より御礼を申し上げます。また、研究生活を実りあるものにしてくれた口腔予防医学分野の皆様に感謝申し上げます。

## 参考文献

1. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol.* 1997; **33**: 302-12.
2. Salaspuro MP. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003; **17**: 679-94.
3. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2007; **99**: 777-89.
4. Dellarco VL. A mutagenicity assessment of acetaldehyde. *Mutat Res.* 1988; **195**: 1-20.
5. Obe G, Anderson D. International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC Working Paper No. 15/1. Genetic effects of ethanol. *Mutat Res.* 1987; **186**: 177-200.
6. Secretan B, Straif K, Baan R, Grosse Y, El Ghissassi F, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol.* 2009; **10**: 1033-4.

7. Homann N, Jousimies-Somer H, Jokelainen K, Heine R, Salaspuro M. High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: methodological aspects and pathogenetic implications. *Carcinogenesis*. 1997; **18**: 1739-43.
8. Salaspuro V, Salaspuro M. Synergistic effect of alcohol drinking and smoking on in vivo acetaldehyde concentration in saliva. *Int J Cancer*. 2004; **111**: 480-3.
9. Miyakawa H, Baraona E, Chang JC, Lesser MD, Lieber CS. Oxidation of ethanol to acetaldehyde by bronchopulmonary washings: role of bacteria. *Alcohol Clin Exp Res*. 1986; **10**: 517-20.
10. Moazzez R, Thompson H, Palmer RM, Wilson RF, Proctor GB, Wade WG. Effect of rinsing with ethanol-containing mouthrinses on the production of salivary acetaldehyde. *Eur J Oral Sci*. 2011; **119**: 441-6.
11. Jokelainen K, Heikkonen E, Roine R, Lehtonen H, Salaspuro M. Increased acetaldehyde production by mouthwashings from patients with oral cavity, laryngeal, or pharyngeal cancer. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996; **20**: 1206-10.

12. Homann N, Tillonen J, Rintamäki H, Salaspuro M, Lindqvist C, Meurman JH. Poor dental status increases acetaldehyde production from ethanol in saliva: a possible link to increased oral cancer risk among heavy drinkers. *Oral Oncol.* 2001; **37**: 153-8.
13. Chang JS, Lo HI, Wong TY, Huang CC, Lee WT, Tsai ST, *et al.* Investigating the association between oral hygiene and head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2013; **49**: 1010-7.
14. Ahrens W, Pohlabeln H, Foraita R, Nelis M, Lagiou P, Lagiou A, *et al.* Oral health, dental care and mouthwash associated with upper aerodigestive tract cancer risk in Europe: the ARCAGE study. *Oral Oncol.* 2014; **50**: 616-25.
15. Tillonen J, Homann N, Rautio M, Jousimies-Somer H, Salaspuro M. Role of yeasts in the salivary acetaldehyde production from ethanol among risk groups for ethanol-associated oral cavity cancer. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999; **23**: 1409-15.
16. Nieminen MT, Uittamo J, Salaspuro M, Rautemaa R. Acetaldehyde production from ethanol and glucose by non-*Candida albicans* yeasts in vitro. *Oral Oncol.* 2009; **45**: e245-8.
17. Uittamo J, Siikala E, Kaihovaara P, Salaspuro M, Rautemaa R. Chronic candidosis and oral cancer in APECED-patients: production of carcinogenic acetaldehyde from glucose and ethanol by *Candida albicans*. *Int J Cancer.* 2009; **124**: 754-6.

18. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994; **5**: 66-77.
19. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*. 2005; **43**: 5721-32.
20. Muto M, Hitomi Y, Ohtsu A, Shimada H, Kashiwase Y, Sasaki H, *et al*. Acetaldehyde production by non-pathogenic *Neisseria* in human oral microflora: implications for carcinogenesis in upper aerodigestive tract. *Int J Cancer*. 2000; **88**: 342-50.
21. Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Grönroos L, *et al*. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol*. 2007; **43**; 181-6.
22. Uittamo J, Nieminen MT, Kaihovaara P, Bowyer P, Salaspuro M, Rautemaa R. Xylitol inhibits carcinogenic acetaldehyde production by *Candida* species. *Int J Cancer*. 2011; **129**: 2038-41.
23. Takeshita T, Matsuo K, Furuta M, Shibata Y, Fukami K, Shimazaki Y, *et al*. Distinct composition of the oral indigenous microbiota in South Korean and Japanese adults. *Sci Rep*. 2014; **4**: 6990.

24. Takeshita T, Nakano Y, Yamashita Y. Improved accuracy in terminal restriction fragment length polymorphism phylogenetic analysis using a novel internal size standard definition. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; **22**: 419-28.
25. Takeshita T, Yasui M, Tomioka M, Nakano Y, Shimazaki Y, Yamashita Y. Enteral tube feeding alters the oral indigenous microbiota in elderly adults. *Appl Environ Microbiol.* 2011; **77**: 6739-45.
26. Chen T, Yu WH, Izard J, Baranova OV, Lakshmanan A, Dewhirst FE. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford)*. 2010; baq013.
27. Theruvathu JA, Jaruga P, Nath RG, Dizdaroglu M, Brooks PJ. Polyamines stimulate the formation of mutagenic 1,N<sup>2</sup>-propanodeoxyguanosine adducts from acetaldehyde. *Nucleic Acids Res.* 2005; **33**: 3513-20.
28. Zero DT, Raubertas RF, Fu J, Pedersen AM, Hayes AL, Featherstone JD. Fluoride concentrations in plaque, whole saliva, and ductal saliva after application of home-use topical fluorides. *J Dent Res.* 1992; **71**: 1768-75.