

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10472

研究課題名(和文) 予防歯科におけるチェアサイドPCR法の確率とREDコンプレックス除菌療法の展開

研究課題名(英文) Establishment of the Chairside PCR Method and Development of RED Complex Sterilization Therapy in Preventive Dentistry

研究代表者

山田 秀則 (Yamada, Hidenori)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：60240032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：小型簡便なリアルタイムPCR装置を用い菌種特異的プライマー、蛍光プローブを設計し新設計したプローブでマルチプレックスリアルタイムPCR法を開発した。S. mutansを検出するために新設計したプローブ/プライマーセットを用いマルチプレックスリアルタイムPCR法を開発した。P. gingivalis、T. denticola、T. forsythiaを検出する理論上の最小コピー数、S. m、P.g、T.d、T.fの理論上の最小コピー数はそれぞれ1、4、3であった。PCR法はヒト唾液中のS. m、P.gのコロニー形成を同時に検出した。コンベンショナルPCRとの測定結果を比較し遜色ない結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病原菌で「Red Complex」であるP. gingivalis、Treponema denticola、および Tannerella forsythia は、これまでキットによるリスク判定や、選択培地による嫌気性培養が必要で培養および判定に時間を要していた。今回の研究では、唾液からリアルタイムPCRデバイスにより、チェアサイドでこれらの感染とリスク管理を行うための特異的なプローブ、プライマーの設計を行い評価した。唾液を検体とした臨床における迅速なリスク評価に適している。

研究成果の概要(英文)：Colonization by several oral pathogens and the onset of oral diseases, such as dental caries and periodontal diseases, are closely related. Therefore, the analysis of pathogens in oral specimens would be helpful for the risk assessment of oral diseases. We developed a rapid multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) method using a portable device and newly designed probe/primer sets to detect the oral pathogens Streptococcus mutans, Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia. The theoretical minimum detectable cell numbers of S. mutans, P. gingivalis, T. denticola, and T. forsythia were 1, 1, 4, and 3, respectively. The multiplex real-time PCR system simultaneously detected the colonization of S. mutans and P. gingivalis in human saliva. These results suggest that the multiplex real-time PCR system may be useful for the risk assessment of oral diseases.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：REDコンプレックス リアルタイムPCR 唾液

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

う蝕や歯周疾患は代表的な非感染性疾患のひとつである。病原菌の同定には多くの場合、選択培地とリアルタイム PCR が利用される。しかし歯周病菌の同定には、細菌を採取し菌種特定のため外部へ検査を委託する必要がある。また、リアルタイム PCR 装置は臨床検査室で技術者によって検出されていた。そのためチェアサイドで直ちに処置や使用薬剤を決定することが困難であった。

今回、3種の Red コンプレックスである、*P.gingivalis*、*T.denticola*、*T.forsythia*を迅速に検出できる PCR 法を開発した。ポータブルマルチプレックスモバイルリアルタイム PCR により *S.mutans* も同時に検出した。*S.mutans*、*P.gingivalis*、*T.denticola*、*T.forsythia* 理論的最小検出細胞数は 1、1、4、3 であった。

標準的な研究室にあるコンベンショナル PCR とリアルタイム PCR 装置と比較したところ、遜色ない結果であった。

2. 研究の目的

モバイルリアルタイム PCR を用い、3菌種の歯周病菌 (RED コンプレックス) を同時検出するチェアサイド PCR 法を確立する。これまでは選択培地により時間を要していた。またリアルタイム PCR 装置は大きく熟練した術者による操作が必要である。モバイルリアルタイム PCR によるチェアサイド PCR 法を臨床応用し、歯面薬剤輸送システム (Dental Drug Delivery System (3DS)) と組み合わせ、予防歯科診療室における RED コンプレックス除菌システムを構築することを目的とした。

チェアサイド PCR 法を確立し、Dental Drug Delivery System (3DS) と組み合わせた臨床研究を実施する。最終的にはチェアサイド PCR 法を活用して、歯周病菌除菌のための薬剤を選択あるいは開発し効果的な歯周病菌除菌システムの構築を目的とした。

3. 研究の方法

プローブとプライマーのセットを表 1 に示す。*S.mutans* の種特異的なプローブ/プライマーは *gtfC* 遺伝子配列から設計された。他のセットは 16S rRNA 遺伝子配列の可変領域から設計された。

普遍的なプローブ/プライマー - セットはこれらの保存領域に基づいて設計された。

同一性のある領域は、NCBI の BLAST プログラムを用いて、他の細菌遺伝子とのクロスハイブリダイゼーションの可能性を調査した。すべてのプローブとプライマーは Eurofins Genomics 社により合成された。

さらに、*S.mutans* UA 159、*P.gingivalis* ATCC 33277、*T.denticola* ATCC 35405、*T.forsythia* ATCC 43037 の口腔内細菌 20 株を用いてプライマーの特異性を評価した。

唾液サンプルからのゲノム DNA の抽出は、鶴見大学歯学部付属病院に定期検診で受診する外来患者が 9 名から採得した。ゲノム DNA は QIAamp DNA Microbiome Kit を用い単離した。DNA 濃度は分光光度計を用いて測定した。ゲノム DNA サンプルの 1 μ L をリアルタイム PCR 装置に使用した。ゲノム DNA 重量は copy number calculator for real-time PCR を用いて理論細胞数を換算した。

S.mutans UA 159、*P.gingivalis* ATCC 33277、*T.denticola* ATCC 35405、*T.forsythia* ATCC 43037 の全ゲノム DNA の長さはそれぞれ 2,032,925bp、2,354,886bp、2,843,201bp、3,281,748bp

であった。

表1. リアルタイムPCR用の種特異的プローブ

Primer/Probe sets	Product size (bp)
<i>Streptococcus mutans</i>	116
5' - GCATGTTGTTGAAGGAAGAGGTT - 3'	
5' - TGCCAGGACCAAGTCTCTTC - 3'	
5' - FAM - TCCCAGTGGTTTCTTTGATCATGACTGGCATAACG - BHQ-1 - 3'	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	122
5' - GCGTATGCACTTGCCTTACAG - 3'	
5' - GACGCATGCCTATCTTACAGTA - 3'	
5' - FAM - CCGTTGAAAGACGGACTAAAACCGCATACTTGT - BHQ-1 - 3'	
5' - ROX - CCGTTGAAAGACGGACTAAAACCGCATACTTGT - BHQ-2 - 3'	
<i>Treponema denticola</i>	98
5' - GCGGTTAGGTAAGCCTGGT - 3'	
5' - TTGGAATTCGGTTCCCTC - 3'	
5' - FAM - TCTACGAGCTCAACTGTAACGTCATTGGGTAC - BHQ-1 - 3'	
<i>Tannerella forsythia</i>	112
5' - GTAACCTGCCGCAACAGA - 3'	
5' - ATGCCATCCGCAACAA - 3'	
5' - FAM - TAACAATAAGCCCGATGGGAAACCCCT - BHQ-1 - 3'	
Universal	167
5' - TCGTAGTAATCGRSATCAG - 3'	
5' - GRTACGGTACCTTGTACGAC - 3'	
5' - FAM - TGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACAC - BHQ-1 - 3'	
5' - Cy5 - TGAATACGTTCCCGGGCCTGTGTACACAC - BHQ-3 - 3'	

S. mutans probe labeled with FAM was used for both singleplex and multiplex assays. *P. gingivalis* and universal probes labeled with ROX and Cy5 were used for multiplex real-time PCR.

Equimolar mixed base oligo: R; A or G, S; C or G.

FAM; 6-carboxyfluorescein, ROX; rhodamine Red X, Cy5; cyanine dye 5, BHQ; Black Hole Quencher

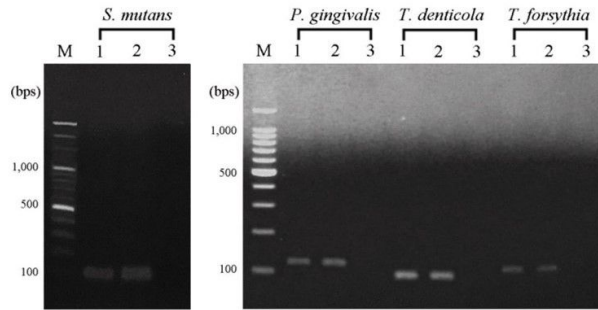


図1. リアルタイムPCR用の特異的プライマーによる増幅バンド。従来のPCRは Materials and Methodsに記載されているように行った。*S. mutans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*の増幅バンドのサイズは約116bp, 122bp, 98bp, 112bpである。レーン1: 鋳型DNAには1pgの目的ゲノムDNAが含まれていた。レーン2: 鋳型DNAには各ゲノムDNAが1pgずつ含まれていた。レーン3: 目的ゲノムDNAを含まない各ゲノムDNA 1pgを含む鋳型DNA。注: トリミングしたゲル写真を示す。

表2. リアルタイムPCRシステム間の検出状況の比較

Amount of total genomic DNA used (ng)	Ct value			
	<i>S. mutans</i>		<i>P. gingivalis</i>	
	PCR1100	StepOnePlus	PCR1100	StepOnePlus
Subject A 1.9	detected	detected	detected	detected
Subject B 7.0	detected	detected	detected	detected
Subject C 9.0	detected	detected	detected	detected
Subject D 4.2	Not detected	Not detected	detected	detected
Subject E 5.7	detected	detected	detected	detected
Subject F 1.5	detected	detected	detected	detected
Subject G 4.6	Not detected	Not detected	detected	detected
Subject H 3.4	detected	detected	detected	detected
Subject I 5.9	Not detected	Not detected	detected	detected

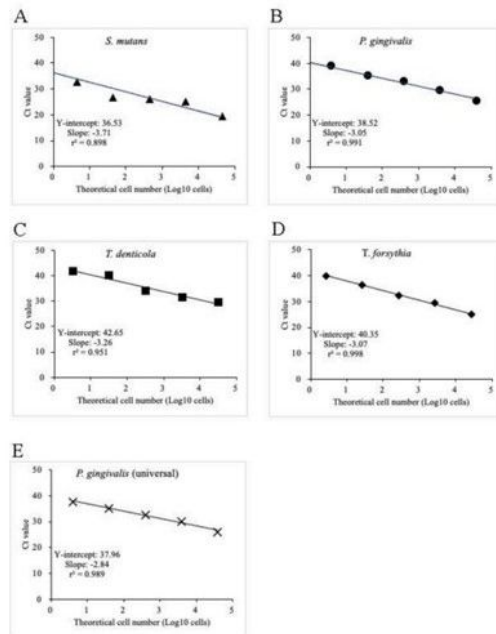


図2. Ct値と細胞数の相関。標準曲線は、Materials and methodsに記載の増幅プロットから作成した。A: *S. mutans*, B: *P. gingivalis*, C: *T. denticola*, D: *T. forsythia*, E: *P. gingivalis* (universal), 使用したユニバーサルプローブ/プライマーセット。

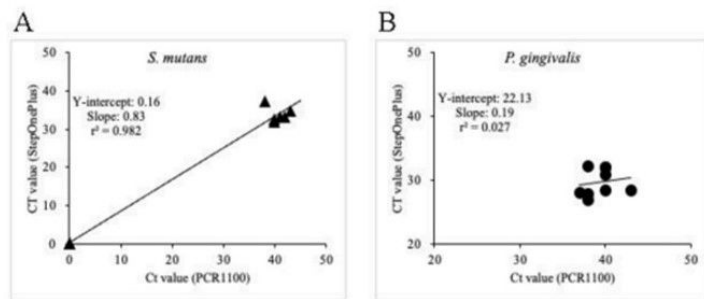


図3. ヒト唾液サンプルを用いたPCR1100とStepOnePlusのCt値比較。Ct値はPCR1100とStepOnePlusの両方から取得し、回帰直線はMaterials and methodsに記載したように作成した。A: *S. mutans*、B: *P. gingivalis*

実験用に以下の DNA テンプレート溶液を調製した。この溶液には各細菌ゲノム DNA を 1pg/ μ L 含む。PCR 増幅は KAPA3G Plant PCR Kit を用いて行った。反応混和物 20 μ L には 1 μ L のテンプレート DNA 溶液、0.3 μ M のセンスおよびアンチセンスプライマー、1 \times KAPA Plant PCR Buffer および 0.5 unit のポリメラーゼ。サイクリックパラメーターでは以下の様に設定した。(1) 95 15 秒間; (2) 95 4 秒間、64 で 6 秒間を 35 サイクル; (3) 4 で休止。増幅された DNA バンドは上記の様に確認した。

すべてのリアルタイム PCR 増幅は次の様に KAPA3G Plant PCR Kit を用いて行った。反応混和物 (20 μ L) には適量のテンプレート DNA 溶液、0.3 μ M のセンスおよびアンチセンスプライマー、0.7 μ M のプローブ、1 \times KAPA Plant PCR Buffer、1.5 ユニットのポリメラーゼ、さらに塩化マグネシウムを加えた。サイクリックパラメーターは 95 で 15 秒、95 で 5 秒、64 で 30 秒のサイクルを 45 回繰り返した。臨界閾値のサイクル (Ct) は閾値蛍光に達したサイクル数として各装置で自動的に設定された。マルチプレックスリアルタイム PCR は、PCR1100 と Step One Plus システムの両方を用いて行い *S. mutans* と *P. gingivalis* の検出結果を比較した。各反応は 3 連で行った。

統計分析は、正規性を改善するために、各細胞数を対数変換した。ピアソン相関係数を用いて Ct 値と細胞数の関係を解析した。線回帰分析も行った。

4. 研究成果

リアルタイム PCR プライマーの特異性を確認するために、従来の調整したテンプレート DNA 溶液を用いて行った。非特異的なバンドは見られなかった (図 1)。

Ct 値と細胞数には非常に有意な負の相関が見られた (図 2)。

ピアソン相関係数 (r) とそれに対応する P 値は次のようであった。

S. mutans ($r = -0.948, P = 0.004$)、*P. gingivalis* ($r = 0.996, P < 0.001$)、*T. denticola* ($r = -0.975, P = 0.005$)、*T. forsythia* ($r = -0.999, P < 0.001$) および、*P. gingivalis* (universal primer, $r = 0.994, P < 0.001$) であった。

理論上の最小検出細胞数は、*S. mutans* は 1、*P. gingivalis* は 1、*T. denticola* は 4、*T. forsythia* は 3 であった。

表 2 に示すように、PCR1100 と従来の Step one Plus リアルタイム PCR システムとの Ct 値の相関結果を示す。*S. mutans* では相関が見られたが *S. gingivalis* では認められなかった (図 3)。

ピアソンの相関係数と対応する P 値は次の通りであった。

S. mutans ($r = 0.991, P < 0.001$)、*P. gingivalis* ($r = 0.164, P = 0.673$)

リアルタイム PCR システムはあらゆる微生物の検出に用いられている。しかし装置が大きく高度なオペレーターが必要である。その欠点を克服するために、新たに設計したフローブ/プライマーを用い携帯性に優れ簡便で短時間で分析できる PCR1100 を用い、従来のリアルタイム PCR と比較した。

ヒト唾液サンプル中の *S. mutans*、*P. gingivalis* の検出について Step One Puls PCR と PCR1100 では検出、非検出では結果は一致した。このことからう蝕と歯周病のリスク評価を同時にできることが示された。Ct 値では *P. gingivalis* では強い相関は見られなかった。う蝕と歯周病菌について臨床におけるチェアサイドでの簡便なリスク評価に貢献できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Wit Yee Wint, Mayu Miyanohara, Hidenori Yamada, Takako Nakatsuka, Masaaki Okamoto, Kofuchi Ryo, Tomoko Tanaka, Nobuhiro Hanada, Takatoshi Murata	4. 巻 109
2. 論文標題 Rapid multiplex real-time PCR assay using a portable device for the detection of oral pathogens	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Diagnostic Microbiology & Infectious Disease	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.diagmicrobio.2024.116214	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Masao Ishikawa, Takatoshi Murata, Masaaki Okamoto, Mayu Miyanohara, Mamiko Yamashita, Nobuhiro Hanada, Hidenobu Senpuku, Koji Shibuya	4. 巻 368
2. 論文標題 Inhibitory effect of black cumin (Nigella sativa) seed essential oil on Fusobacterium nucleatum L-methionine-lyase (L-methioninase) activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsle/fnab041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nomura Yoshiaki, Tsutsumi Ikki, Nagasaki Masatoshi, Tsuda Hiromitsu, Koga Fumihiro, Kashima Naho, Uraguchi, Masahide, Okada Ayako, Kakuta Erika, Hanada Nobuhiro	4. 巻 2020
2. 論文標題 Supplied Food Consistency and Oral Functions of Institutionalized Elderly	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Dentistry	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/3463056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nomura Yoshiaki, Ishii Yoshimasa, Suzuki Shunsuke, Morita Kenji, Suzuki Akira, Suzuki Senichi, Tanabe Joji, Ishiwata Yasuo, Yamakawa Koji, Chiba Yota, Ishikawa Meu, Sogabe Kaoru, Kakuta Erika, Okada Ayako, Otsuka Ryoko, Hanada Nobuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Nutritional Status and Oral Frailty: A Community Based Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2886 ~ 2886
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12092886	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Yoshiaki, Otsuka Ryoko, Hasegawa Ryo, Hanada Nobuhiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Oral Microbiome of Children Living in an Isolated Area in Myanmar	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 4033 ~ 4033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph17114033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murata T, Yamashita M, Ishikawa M, Shibuya K, Hanada N	4. 巻 151
2. 論文標題 Purification of a High Molecular Mass Protein Streptococcus mutans.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 journal of visualized experiments : JoVE	6. 最初と最後の頁 JoVE
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/59804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 村田貴俊
2. 発表標題 菌体外で検出されるStreptococcus mutansコラーゲン結合タンパク(Cnm)複合体(Detection of collagen-binding protein(Cnm) complex in Streptococcus mutans culture supernatant)
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田秀則, 宮之原真由, 曾我部薫, 岡田彩子, 武内博朗, 村田貴俊, 野村義明, 花田信弘.
2. 発表標題 全身的な健康を歯科から考える“予防医学”としての概念を歯科へ「3DS除菌外来」の試み 第八報
3. 学会等名 第70回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮之原真由, 村田貴俊, 山田秀則, 中塚貴子, 影島宏紀, 岡本公彰, 花田信弘.
2. 発表標題 舌清掃およびTHP 3DS paste IIを併用したカンジダの除菌効果
3. 学会等名 第70回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田秀則, 宮之原真由, 曾我部薫, 岡田彩子, 武内博朗, 村田貴俊, 野村義明, 花田信弘
2. 発表標題 全身的な健康を歯科から考える“予防医学”としての概念を歯科へ。「3DS除菌外来」の試み 第七報
3. 学会等名 第69回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田彩子, 村田貴俊, 有吉芽生, 大塚良子, 山下万美子, 小坂美樹, 鈴木 恵, 赤間ひとみ, 植松裕美, 今村安芸子, 佐藤 勉, マティン カイルール, 花田信弘
2. 発表標題 血管内皮機能に対する歯周組織健康状態改善の有効性評価(第3報):ランダム化並行群間比較試験
3. 学会等名 第69回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 花田 信弘 , 野村 義明 , 村田 貴俊 , 岡本 公彰
2. 発表標題 【腸内フローラとディスバイオーシス(バランス失調)】口腔微生物叢と歯のケアが腸内微生物叢に及ぼす影響
3. 学会等名 (公財)ヤクルト・バイオサイエンス研究財団:腸内フローラシンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村田 貴俊 (Murata takatoshi) (10313529)	鶴見大学・歯学部・講師 (32710)	
研究分担者	花田 信弘 (Hanada Nobuhiro) (70180916)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	削除:2021年3月8日
研究分担者	宮之原 真由 (Miyanohara Mayu) (70460186)	鶴見大学・歯学部・学部助手 (32710)	
研究分担者	野村 義明 (Nomura Yoshiaki) (90350587)	鶴見大学・歯学部・学内教授 (32710)	削除:2022年2月22日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------