

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09940

研究課題名(和文) 全身疾患関連口腔細菌遺伝子の迅速検出法の確立

研究課題名(英文) Establishment of rapid detection method for oral bacterial genes associated with systemic diseases

研究代表者

北川 雅恵 (Kitagawa, Masae)

広島大学・医系科学研究科(歯)・研究員

研究者番号：10403627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：一般歯科で全身疾患に関連する口腔内細菌の検出を可能にすることを目的に、まず脳内微小出血の関連で注目されている $cnm$ 遺伝子陽性 $Streptococcus mutans$  ( $cnm+S.mutans$ ) を唾液から迅速簡便な検出をLAMP法を用いて試み、採取から2日で $cnm$ 遺伝子を検出可能とした。本方法での臨床検体の保菌率は20%程度であった。動物実験では高血圧ラットモデルに $cnm+S.mutans$ を感染させ、コントロールより血管の拡張が多いことを示した。745名のアンケートによる2親等までの家族歴との相関では、2検定でP値1%以下となり $cnm+S.mutans$ 保菌と脳血管疾患の家族歴に相関を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

う蝕原因菌や歯周病原細菌が全身疾患と関係することが明らかとされ、患者が保菌する菌種が注目されている。一方で歯科医療において菌種を同定する検査を行うには、設備、費用、技術面において困難な点が多い。本研究ではこれまで扱いにくいとされた唾液を用い、できるだけ容易に検出を行うためLAMP法によって遺伝子を増幅することを試み、 $cnm$ 遺伝子陽性 $Streptococcus mutans$ を唾液から上記方法で検出を可能にした。このことは、歯科における新しい治療の可能性を示しているだけでなく、今後、全身疾患と関連する菌種の検出を増やすことで、医科歯科連携による全身疾患の予防や治療にも貢献できる。

研究成果の概要(英文)：To enable the detection of oral bacteria related to systemic diseases in general dentistry, we first attempted to detect  $cnm$  gene-positive  $Streptococcus mutans$  ( $cnm+S.mutans$ ), which has attracted attention with intracerebral microbleeding, from saliva in a rapid and simple manner using the LAMP method, and were able to detect the  $cnm$  gene within 2 days after collection. The carriage rate of  $S.mutans$  in clinical specimens was about 20% using this method. In animal experiments,  $cnm+S.mutans$  infected hypertensive rat models showed more dilated blood vessels than controls, and a correlation between  $cnm$  gene carriage and family history of cerebrovascular disease was observed in 745 subjects, with a P value of less than 1% by 2 test.

研究分野：口腔病理学

キーワード： $cnm$ 遺伝子 LAMP法 迅速検査 唾液 全身疾患

1. 研究開始当初の背景

口腔内細菌と全身疾患との関係が注目され、これらの菌を検出することで保菌する菌種に対して有効な治療法の選択が可能となる。しかしながら、一般歯科診療所においてこれらの菌を簡易に検出することは設備や技術などの問題があり、未だ確立されていない。全身疾患に関連する菌を一般歯科診療所において検出できれば、歯科治療だけでなく、医科歯科連携によって全身疾患の治療および予防が促進され、患者の QOL の向上に役立つと考える。そこで、本研究では一般歯科で全身疾患に関連する口腔内細菌の検出を可能にすることを目的に、まず、脳内微小出血と関連することで注目されている *cnm* 遺伝子陽性 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) をターゲットとして唾液から LAMP 法を用いて迅速簡便に *cnm* 遺伝子を検出することを試みることにした。また、血液検体からの検出も ELISA 法によって *cnm* 遺伝子陽性 *S. mutans* (*cnm+S. mutans*) の検出を検討することとした。

2. 研究の目的

検体を唾液および血液として *cnm+S. mutans* 検出法を構築、その精度を検討し、臨床的に有意義な *cnm+S. mutans* の臨床検査法の確立を目指す。

3. 研究の方法

- 1) LAMP 法による *cnm+S. mutans* の迅速・簡易検出法の構築  
*cnm* 遺伝子検出用のプライマーを作製するだけでなく、培養した唾液を直接反応できるように検討を行い、*cnm* プライマーの感度、特異度を検討した。
- 2) LAMP 法による *cnm+S. mutans* 遺伝子検査の精度の検討  
100 サンプルの唾液から培養して得られた菌から PCR 法と LAMP 法で *cnm* 遺伝子の検出を行い、その陽性率を比較した。
- 3) *cnm+S. mutans* 感染マウスモデルを用いた検討  
*cnm+S. mutans* を高血圧モデルラットに歯性感染させ、*cnm+S. mutans* の脳への移行の確認を行うとともに、血清を採取し *cnm+S. mutans* の血清抗体価を測定した。
- 4) *cnm+S. mutans* 保菌状況と家族歴との関係に関する調査  
*S. mutans* の家族内伝播の特性から家族歴と *cnm+S. mutans* 保菌の関係をアンケート調査し、相関を調べた。
- 5) 唾液による *cnm+S. mutans* 検出法を用いた臨床介入研究  
確立した *cnm+S. mutans* 検出法を用いて *cnm* 遺伝子陰性者と陽性者について *Lactobacillus rhamnosus* L8020 tablet を 4 週間摂取することによる菌数への影響について調査し、本方法の研究用ツールとしての有用性を検討した。
- 6) *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) *fimA* type の検出  
*cnm+S. mutans* 遺伝子の他に全身疾患に関連する *P. gingivalis fimA* type I-V についても LAMP 法による検出を確立した。

4. 研究成果

- 1) LAMP 法による *cnm+S. mutans* の迅速・簡易検出法の構築  
作製した *cnm* プライマーは *cnm* plasmid DNA にのみ反応した (下図 A)。 $10^3$  個以上の細胞数、 $10^{-5}$  OD で検出可能であった (下図 B・C)。*S. sobrinus*、*P. gingivalis*、*Candida* spp では混濁しなかった (下図 D)。唾液は MSB 培地では培養 1 日目では検出可能であった (下図 E)。(Kitagawa M. et al., Anal Biochem. 2020;605:113812.)
- 2) LAMP 法による *cnm+S. mutans* 遺伝子検査の精度の検討  
102 サンプルの唾液から培養して得られた菌から LAMP 法で *cnm* 遺伝子の反応を行ったところ、27 サンプルが陽性となった (下図 F)。なお、同様のサンプルで PCR 法では陽性は 13 サンプルであった (Kitagawa M. et al., Anal Biochem. 2020;605:113812.)

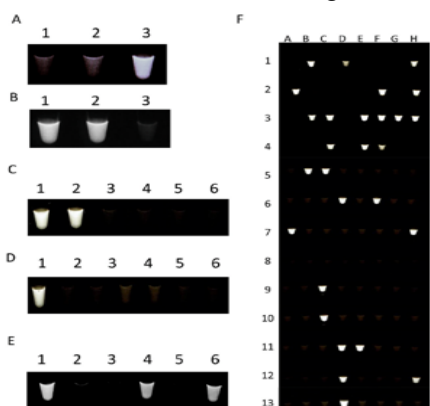
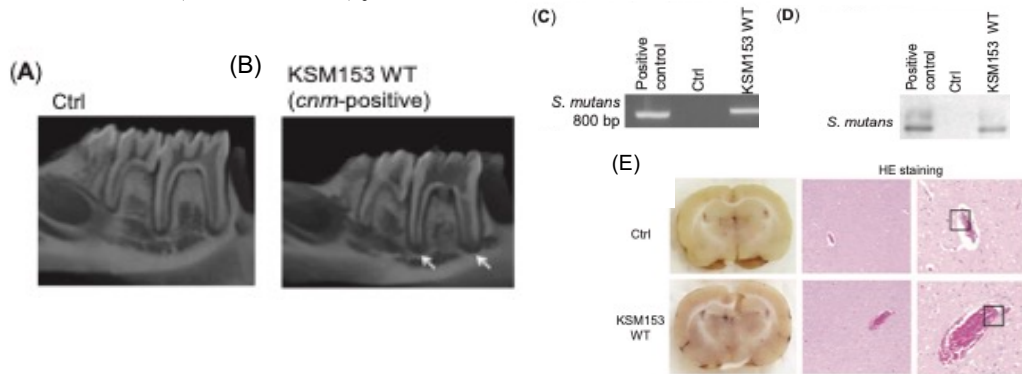


Fig. 1. LAMP detection of the *cnm* gene. (A) Specificity test. 1: negative control (no DNA), 2: human genomic DNA, and 3: *cnm* plasmid DNA. (B) Sensitivity test with *cnm* plasmid DNA. 1:  $10^4$  molecules, 2:  $10^3$  molecules, and 3:  $10^2$  molecules. (C) Sensitivity test using the diluted solution of the *cnm*-positive strain 1:  $10^{-4}$  OD, 2:  $10^{-5}$  OD, 3:  $10^{-6}$  OD, 4:  $10^{-7}$  OD, 5:  $10^{-8}$  OD, and 6: negative control. (D) Detection of the *cnm* gene in *S. sobrinus*, *P. gingivalis*, and *Candida* spp. 1: positive control (*cnm*-positive strains), 2: *S. sobrinus* (cells) 3: *S. sobrinus* (DNA), 4: *P. gingivalis* (cells), 5: *P. gingivalis* (DNA), 6: *Candida* spp. (cells), and 7: *Candida* spp. (DNA). (E) Comparison of culture differences. 1: positive control (*cnm* plasmid DNA), 2: negative control, 3: saliva cultured in BHI medium for 1 day, 4: all colonies cultured on MSB agar for 1 day, 5: saliva cultured in BHI medium for 2 days, and 6: all colonies cultured on MSB agar for 2 days. (F) Positive rates of the *cnm* gene in 102 samples. The *cnm* gene expression in 102 samples was examined by the LAMP method and 27 samples were positive. Positive control (*cnm*-positive DNA, H12). Negative control (no DNA, H13). LAMP, loop-mediated isothermal amplification; BHI, brain heart infusion; MSB, Mitis-Salivarius agar containing bacitracin.

- 3) *cnm*+*S. mutans* 感染マウスモデルを用いた検討  
*cnm*+*S. mutans* を高血圧モデルラットに歯性感染させた(下図 A, B)。血液中の *S. mutans* を PCR および抗体で確認できた(下図 C, D)。  
 さらに、脳組織において血管の拡張が *cnm*+*S. mutans* 感染群では顕著で、血管周囲に *S. mutans* が認められた(下図 E)。(Taniguchi Y. et al., Clin Exp Immunol. 2022;uxac094.)  
 なお、これらのラットの血清を用いて *cnm*+*S. mutans* を抗原として血清抗体価を測定できるかを検討したところ、*S. mutans* の検出は可能だったが、*cnm* タンパクの検出はできなかった(data not shown)。



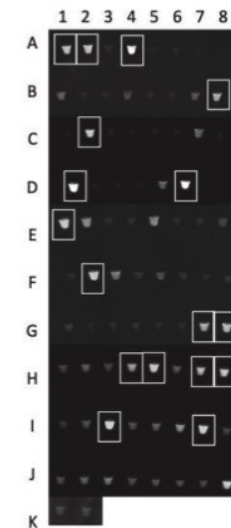
- 4) *cnm*+*S. mutans* 保菌状況と家族歴との関係に関する調査  
 745名のボランティアの唾液採取および家族歴を聴取し、2親等までで脳血管疾患の家族歴との相関を調べたところ  $\chi^2$  検定でP値1%以下となり、*cnm* 遺伝子保菌と脳血管疾患の家族歴に相関が認められた(右表)。ただし、脳出血単独では相関が認められなかった。
- 5) 唾液による *cnm*+*S. mutans* 検出法を用いた臨床介入研究  
 81名を対象に *Lactobacillus rhamnosus* L8020 tablet の *cnm*+*S. mutans* 菌数に対する影響を検討した。81名の対象者のうち17名(21%)に *cnm* 遺伝子陽性を認め(右図)、開始時に比べて摂取2週間後、4週間後で *cnm* 遺伝子陰性者、陽性者いずれも有意に菌数は低下した(下表)。(北川ら, 日本口腔検査学会雑誌, 15(1), 9-13, 2023)

	家族歴+	家族歴-
<i>cnm</i> +	47	136
<i>cnm</i> -	87	475

表1 タブレット摂取前と摂取後におけるSM菌数スコアの比較  
 いずれの群でも摂取14日後、28日後とも有意に菌数は低下した。

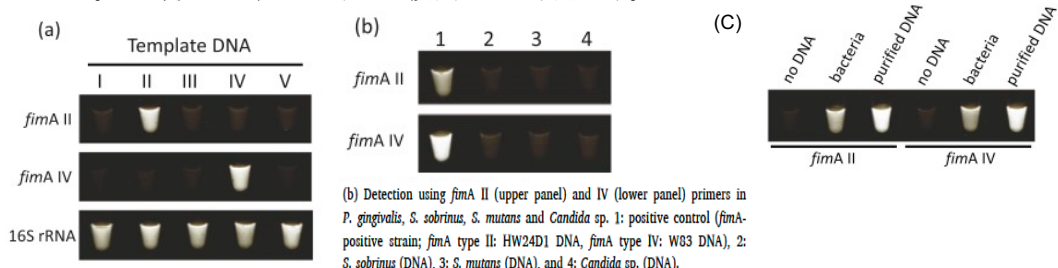
	年齢(歳)	性別	SM菌数スコア				
			摂取前	14日摂取後	p値	28日摂取後	p値
<i>cnm</i> 陰性群	21.3 ± 2.58	男6 女21	1.18 ± 0.92	0.74 ± 0.85	p=0.019*	0.51 ± 0.70	p=0.011*
<i>cnm</i> 陽性群	20.5 ± 0.79	男1 女11	2.00 ± 0.60	1.33 ± 0.77	p=0.014*	0.91 ± 0.79	p=0.007**

\*: p<0.05, \*\*: p<0.01 (Wilcoxonの符号付き順位検定)



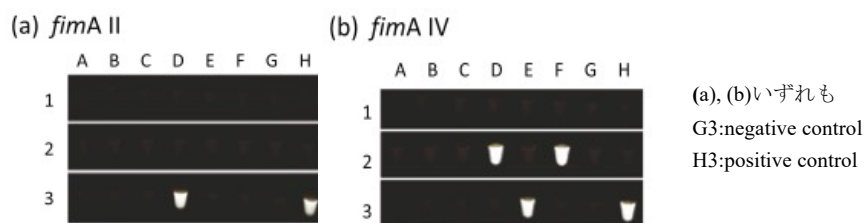
J7:negative control, J8:positive control, 白枠: 陽性判定

- 6) *P. gingivalis fimA* type の検出  
*CnmS. mutans* の次に、全身疾患に関連する *P. gingivalis fimA* type についても LAMP 法による検出を確立した(Kitagawa M. et al., J Microbiol Methods. 2021 Jun;185:106228.)  
 a) LAMP 法による *P. gingivalis fimA* type の迅速・簡易検出法の構築  
*P. gingivalis fimA* type I~V を作製した(下図 a)。以降は歯周炎との報告が多い type II と全身疾患との報告が多い type IV について検討した。  
*fimA* type II プライマーは HW24D1 DNA および IV プライマーは W83 DNA (右図 b, 1) のみ混濁し、*S. mutans* (下図 b, 2), *S.sobrinus* (下図 b, 3), *Candida spp* (下図 b, 4)には反応しなかった。また、反応は菌混濁液でも検出できた(下図 c)。



b) LAMP 法による *P. gingivalis fimA* type II・IV 遺伝子検査の精度の検討

22 サンプルの唾液から培養して得られた菌から LAMP 法で *fimA* type II および type IV 遺伝子の反応を行ったところ、type II は 1 サンプル、type IV は 3 サンプルが陽性となった (下図 a & b)。



まとめ

本研究結果から LAMP 法を用いた口腔内細菌の検出は一般歯科診療所における検査法として適しているだけでなく、食品や薬剤などの菌への影響を検討する研究のツールとしても有用であることを示した。

このことは、歯科における新しい検査・治療の可能性を示しているだけでなく、今後、全身疾患と関連する菌種の検出を増やすことで、医科歯科連携による全身疾患の予防や治療にも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 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Taniguchi Yuri, Ouhara Kazuhisa, Kitagawa Masae, Akutagawa Keiichi, Kawada-Matsuo Miki, Tamura Tetsuya, Zhai Ruoqi, Hamamoto Yuta, Kajiya Mikihiro, Matsuda Shinji, Maruyama Hirofumi, Komatsuzawa Hitoshi, Shiba Hideki, Mizuno Noriyoshi	4. 巻 210
2. 論文標題 Periapical lesion following Cnm-positive Streptococcus mutans pulp infection worsens cerebral hemorrhage onset in an SHRSP rat model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 321 ~ 330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cei/uxac094	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 北川雅恵、田地 豪、長嶺憲太郎、二川浩樹	4. 巻 15
2. 論文標題 Lactobacillus rhamnosus L8020タブレットのcnm遺伝子陽性Streptococcus mutans菌数に対する影響	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本口腔検査学会雑誌	6. 最初と最後の頁 9-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 長嶺憲太郎、木村留美、北川雅恵	4. 巻 33
2. 論文標題 タブレット型培地を用いた口腔内細菌の遺伝子検出	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本臨床微生物学会雑誌	6. 最初と最後の頁 25-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 北川雅恵、長嶺憲太郎	4. 巻 4
2. 論文標題 全身疾患に関わる口腔内細菌の遺伝子検査	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 90-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitagawa M, Ouhara K, Oka H, Sakamoto S, Yamane Y, Kashiwagi A, Kanamoto R, Miyauchi M, Nagamine K.	4. 巻 185
2. 論文標題 Selective and easy detection of the <i>Porphyromonas gingivalis</i> fimA type II and IV genes by loop-mediated isothermal amplification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 106228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mimet.2021.106228	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 Kitagawa M, Nagamine K, Oka H, Ouhara K, Ogawa I, Komatsuzawa H, Kurihara H.	4. 巻 605
2. 論文標題 Rapid detection of the <i>Streptococcus mutans</i> <i>cnm</i> gene by loop-mediated isothermal amplification.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 113812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2020.113812. Epub 2020 Jun 25.	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 北川雅恵, 應原一久, 宮内睦美, 長嶺憲太郎, 柴 秀樹
2. 発表標題 LAMP法による <i>Porphyromonas gingivalis</i> のfimA遺伝子II型とIV型迅速検出
3. 学会等名 第33回日本口腔診断学会第30回日本口腔内科学会第13回日本口腔検査学会合同学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北川雅恵, 田地 豪, 宮田梨恵, 長嶺憲太郎, 柴 秀樹, 二川浩樹
2. 発表標題 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L8020含有タブレット摂取による <i>Streptococcus mutans</i> の口腔保菌の変化
3. 学会等名 第14回日本口腔検査学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長嶺憲太郎, 北川 雅恵
2. 発表標題 全身疾患に関わるミュータンス菌およびジンジパリス菌の遺伝子検査
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長嶺憲太郎、北川雅恵、木村留美
2. 発表標題 改良型cnm遺伝子陽性Streptococcus mutans迅速検出
3. 学会等名 第34回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2023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	栗原 英見  (Kurihara Hidemi)  (40161765)	広島大学・医系科学研究科(歯)・名誉教授   (15401)	
研究分担者	宮内 睦美  (Miyachi Mutsumi)  (50169265)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授   (15401)	
研究分担者	長嶺 憲太郎  (Nagamine Kentaro)  (80412352)	広島国際大学・健康科学部・教授   (35413)	

6. 研究組織（つづき）

	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	應原 一久  (Ouhara Kazuhisa)  (80550425)	広島大学・医系科学研究科(歯)・助教     (15401)	

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