

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10214

研究課題名(和文) LAMP法による誤嚥性肺炎起炎菌の迅速同定検出法の開発と口腔ケアへの有効性

研究課題名(英文) Identification of Pathogenic Bacteria in Aspiration Pneumonia by LAMP Method

研究代表者

星野 倫範 (HOSHINO, Tomonori)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：00359960

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)：本研究の目的は、誤嚥性肺炎の原因となるPrevotella属の菌種と歯周炎等の口腔疾患の原因となるPorphyromonas属の菌種のLAMP法を用いた検出同定法を確立することである。そこで、Type IX secretion systemコードする遺伝子群のうち、porK遺伝子に着目し、Prevotella属、Porphyromonas属の5菌種に対してLAMPプライマーを設計した。これらのプライマーを用い、各菌種の精製ゲノムDNAを鋳型としたLAMP法を行ったところ、菌種特異的陽性反応を示し、in vitroの系ではこれらの菌種を同定するのに有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの口腔ケアは、盲目的に口腔清掃を行い、単純に口腔内の細菌数を減少させるものであった。しかし、口腔ケアを行う前にその患者にどのような細菌がいるか、つまり誤嚥性肺炎や歯周疾患の原因菌が存在するかどうか把握されていれば、それらの細菌種の棲息部位、つまり口腔のどの部位、あるいはどのような手法で口腔ケアを行うべきかといった選択的な口腔ケアを確立することが可能となる。これにより脳脊髄麻痺のある障害児や高齢者などの誤嚥性肺炎のリスクを有する口腔ケアの必要な人に病原性のある口腔ケア時に注意しなければならない部位や手法がカスタマイズされ、効率的に口腔ケアができるようになるという点で学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：A purpose of this study is to establish the method detecting and identifying the species of the genus Prevotella, one of the causative bacteria of aspiration pneumonia, and the species of the genus Porphyromonas, one of the pathogenic bacteria of oral disease such as periodontitis using the LAMP method. Thus, we focused on porK gene among the gene clusters which encoded Type IX secretion system and designed the species-specific LAMP primers for 5 species among the bacteria belonging to the genus Prevotella and the genus Porphyromonas. The LAMP method with those primers showed species-specific positive reactions when using purified genomic DNA of each bacterial species as the template. Thus, it was suggested that the LAMP method based on porK genes among the genus Prevotella and the genus Porphyromonas would be available for the in-vitro detection and identification of the bacterial species from those genera.

研究分野：小児歯科学

キーワード：誤嚥性肺炎 歯周疾患 LAMP法 菌種同定 Prevotella属 Porphyromonas属 口腔ケア 障害(児)者

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 介入疫学研究によって口腔ケアが誤嚥性肺炎の予防に有効であることが広く認知されるようになった。これとともに、誤嚥性肺炎は口腔内の常在菌が引き起す日和見感染症であることから、器質的な口腔ケアにより口腔内の細菌を減少するという試みが臨床の現場ではなされ、これに関する多数の症例報告もされている。しかし、誤嚥性肺炎の起炎菌に注目した細菌学的側面からの口腔ケアに対する取り組みや研究報告はあまりないのが現状である。そこで本申請研究は、誤嚥性肺炎の起炎菌といわれる *Prevotella melaninogenica* を含む *Prevotella* 属の菌種や歯周炎を始めとした歯周疾患の原因菌である *Porphyromonas* 属の菌種に注目し、①これらの病原菌に対する迅速で簡便な検出同定 LAMP 法の確立、②唾液を検体とした本手法の応用により、これらの菌種の同定検出が可能であるかを検討、③これらの菌種の存在を実際に把握した上でその棲息部位やバイオフィームに対する直接的な口腔ケアの手法の確立できないかを検討することとした。

(2) 近年、脳血管疾患などを基礎疾患とする患者の誤嚥性肺炎が増加し、小児科、小児歯科領域でも知的障害、先天性の全身疾患に伴う脳性麻痺や筋ジストロフィーのある患児などでも摂食嚥下障害が問題となり、それに続く誤嚥性肺炎の発症が問題となっている。

誤嚥性肺炎の起炎菌は口腔内の常在菌であることから、口腔ケアの必要性が指摘され、2000 年前後に介入疫学研究によって口腔ケアを行うことで誤嚥性肺炎が予防できることが証明され、誤嚥性肺炎予防における口腔ケアの重要性が広く認知されるようになった。2012 年の歯科の診療報酬改定でもこの有効性が評価され、口腔ケアは周術期の口腔機能管理として保険導入もされている。このことを背景に効率的な口腔ケアを行う為にはどのような菌種を標的とすべきかを検討するために我々は誤嚥性肺炎のリスクを有する患児を対象として唾液中細菌叢の群集解析を行った。その結果、リスクを有する患児で、誤嚥性肺炎の起炎菌である *Prevotella* 属などの嫌気性菌が増加することを示唆し、これらを標的とした口腔ケアを行うべきであることを指摘した。次にその中でも特にリスクの高い患者で多く検出された *Prevotella melaninogenica* (図 1) に注目し、我々は *P. melaninogenica* の Type IX 分泌システムが病原因子を発症させるメカニズムの 1 つであることを明らかにした。本菌種は、このメカニズムの関与により、通常の抗菌薬に耐性を示すため、 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤配合の抗菌薬が使用される。こうした抗菌薬の連続的な多様は薬剤耐性菌誘発の点で好ましくないことから、誤嚥性肺炎予防のために先だって口腔ケアを行うことが重要であると考え、口腔ケアに先立って誤嚥性肺炎の起炎菌を同定し、その細菌種が棲息している口腔の部位・領域、バイオフィームの状態、またその細菌種の生物学的性状を把握した上で選択的な口腔ケアを行うべきではないかという考えに基づき、研究を遂行することとした。

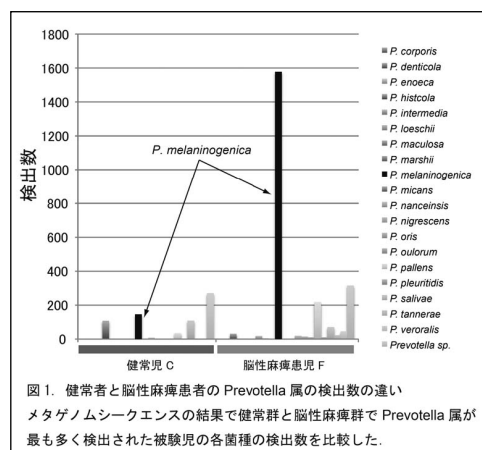


図 1. 健常者と脳性麻痺患者の *Prevotella* 属の検出数の違い  
メタゲノムシーケンスの結果で健常群と脳性麻痺群で *Prevotella* 属が最も多く検出された被験児の各菌種の検出数を比較した。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、誤嚥性肺炎の起炎菌といわれる *Prevotella melaninogenica* を含む *Prevotella* 属の菌種や歯周炎を始めとした歯周疾患の原因菌である *Porphyromonas* 属の菌種を迅速に同定・検出

できるような LAMP 法を開発することであり、これらの病原細菌を同定した上で口腔ケアを行うことは、誤嚥性肺炎の予防に効果的かどうかを検討することである。

(2) これまで我々は、Type IX 分泌システムに注目して研究を行ってきた。今回ターゲットとする Prevotella 属や Porphyromonas 属の菌種はこの分泌システムを有することから、この分泌システムをコードする遺伝子群から適当な遺伝子を選択し、その遺伝子を元にしてこれらの細菌種を同定できるような LAMP 法を開発することを目的とした。

(3) これまでの口腔ケアは、盲目的に口腔清掃を行い、単純に口腔内の細菌数を減少させるものであった。しかし、口腔ケアを行う前にその患者にどのような細菌がいるか、つまり誤嚥性肺炎や歯周疾患の原因菌が存在するかどうかを把握されていれば、それらの細菌種の棲息部位、つまり口腔のどの部位、あるいはどのような手法で口腔ケアを行うべきかといった選択的な口腔ケアを確立することが可能となることから、Prevotella 属や Porphyromonas 属の菌種を同定検出できるような LAMP 法を開発することを目的とした。

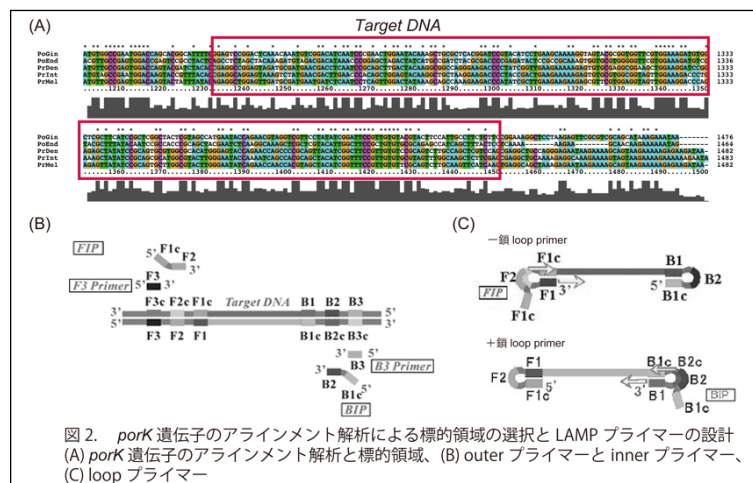
### 3. 研究の方法

(1) DNA データベースから Prevotella 属や Porphyromonas 属の Type IX 分泌システムをコードする遺伝子の抽出

Prevotella 属や Porphyromonas 属の Type IX 分泌システムをコードする遺伝子の DNA データベースからの抽出は、遺伝子配列が既に明らかとなっているものに関しては、NCBI のサイト (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/dna-rna/>) よりキーワードによる検索、あるいはその配列が既知の *Porphyromonas gingivalis* の配列を用いた nucleotide BLAST ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) により抽出を行った。その結果、Prevotella 属からは、*Prevotella intermedia*、*Prevotella melaninogenica*、*Prevotella denticola* の 3 菌種が、Porphyromonas 属からは、*Porphyromonas gingivalis*、*Porphyromonas endodontalis* の 2 菌種が抽出された。

(2) Prevotella 属や Porphyromonas 属の *porK* 遺伝子のアライメント解析

Type IX 分泌システムをコードする遺伝子群のうち、本研究ではとくに *porK* 遺伝子に注目し、解析を行った。上記で抽出された 5 菌種の *porK* 遺伝子に対して、菌種特異的な LAMP プライマーを作成するために遺伝子配列の相同性が比較的異なる領域を選出するために *porK* 遺伝子のアライメント解析を行った。アライメント解析には、Clustal X version 2 software を使用した (図 2A)。



(3) *porK* 遺伝子の遺伝系統解析

Prevotella 属および Porphyromonas 属の *porK* 遺伝子の類似性や近縁関係を予測するために、MEGA X version 10 software を用いて遺伝系統解析を行い、遺伝系統樹を作成した。

(4) *porK* 遺伝子に基づいた LAMP プライマーの設計と作成

アライメント解析より、*porK* 遺伝子の 1235 前後から 1450 前後 (図 2A) に注目し、LAMP 法

用プライマー設計支援ソフトウェア PrimerExplorer V4 (<https://primerexplorer.jp/lamp4.0.0/index.html>) を用いて、インナープライマーとアウタープライマー (図 2B) およびルーブプライマー (図 2C) の設計を行った。LAMP プライマーは、上記の 5 菌種それぞれに対して作成した。

#### (5) *porK* 遺伝子に基づいた LAMP 法による菌種同定の正確性の検討

LAMP 法による菌種同定の正確性については、菌種特異的な反応を示すかどうかを確認するために、対応する *Prevotella* 属からの 3 菌種、*Porphyromonas* 属からの 2 菌種それぞれの精製ゲノム DNA を用い、対象となる菌種の DNA とプライマー、また異なる菌種の DNA とプライマーの組合せでそれぞれ行い、正しい組合せで陽性反応を示すことを確認した。また、複数の精製ゲノム DNA を混合して鋳型とした LAMP 反応で生成産物のシーケンスを行い、目的のものが増幅されていることを確認した。

LAMP 反応には、Loopamp DNA 増幅試薬キット (栄研化学) とリアルタイム濁度測定装置 loopampEXIA (栄研化学) を用いて行った。

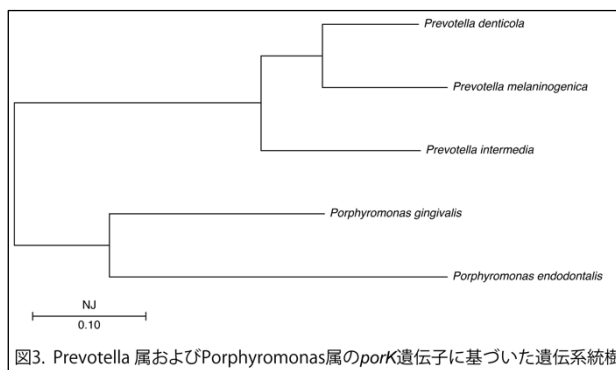
#### (6) ヒト唾液を検体とした場合の LAMP 法による菌種同定検出

ヒト唾液からの細菌 DNA の抽出には、Loopamp PURE DNA 抽出キット (栄研化学) と PureLAMP™ heater (栄研化学) を用いて行い、得られた検体に対して 5 菌種それぞれのプライマーを使用し、Loopamp DNA 増幅試薬キットとリアルタイム濁度測定装置 loopampEXIA を用いて LAMP 反応を行い、臨床応用への可能性を検討した。ヒト唾液サンプルの収集と解析については、明海大学倫理委員会に倫理申請を行い、承認を得た (承認番号 A2106)。

## 4. 研究成果

本研究ではまず、誤嚥性肺炎の起炎菌である *Prevotella melaninogenica* を含む *Prevotella* 属の菌種と近縁の歯周病などの口腔疾患の原因菌となる *Porphyromonas* 属の菌種を Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法により検出同定する方法を確立することとした。これらの細菌属は病原遺伝子の一つとして Type IX secretion system コードする遺伝子群を有している。そこで我々は、これらの遺伝子のうち、*porK* 遺伝子に着目して LAMP 法用のプライマーを作成することとした。

DNA データベースより *porK* 遺伝子を有する菌種を抽出したところ、*Prevotella* 属より *Prevotella melaninogenica* をはじめとした 3 菌種が、*Porphyromonas* 属より、*Porphyromonas gingivalis* をはじめとした 2 菌種がピックアップされ、さらに *Porphyromonas gingivalis* では、3 菌株で同遺伝子が確認された。アライメント解析により、*Porphyromonas gingivalis* では同一菌種内での相同性は 99% 以上で、菌種内ではほぼ保存されていることが示唆された。その一方で、菌種間では一定の相同性は認められるが、多様性があり、菌種特異的なプライマーを作成できることが示唆された。遺伝系統解析では、*Prevotella* 属、*Porphyromonas* 属でそれぞれ 2 つのクラスターが形成され、*Prevotella* 属からみた場合、*Porphyromonas gingivalis* と近縁関係にあった (図 3)。



LAMP プライマーを 5 菌種に対して設計 (表) し、各々精製ゲノム DNA を鋳型とした LAMP 法を行ったところ、菌種特異的に陽性反応を示し、in vitro の系ではこれらの菌種を同定するのに有効であった。その一方で、ヒトの唾液を検体とした LAMP 法では安定した結果を得られなかった。その原因は、使用した検体中に対象となる菌種

表. The LAMP primers synthesized on the basis of *porK* gene

Species	Primer name	5'position	3'position	length	T <sub>m</sub> (°C)	Sequence
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	PoGin-F3	1239	1258	20	59.94	GGACATCAATCCCGAATCGG
	PoGin-B3	1421	1440	20	59.49	CTTTCGGGAAGAGAGGGCAA
	PoGin-FIP			38		TCCACGAACACCGGCTACTA-ACAAGCTGCGCTCACG
	PoGin-BIP			42		GCTCGGCTACTCGTAGCATGA-TGGAAGTACGTACACAACGG
	PoGin-LF	1282	1303	22	61.14	CCTTTTCTTCAGGATGTACGG
	PoGin-LB	1368	1389	22	61.22	ATACCAGAACGTAGTCTGTCC
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	PoEnd-F3	1235	1254	20	56.49	ATGTAGACGACATAAACCCG
	PoEnd-B3	1410	1426	17	60.92	TGATGGCTCTGGCGCACA
	PoEnd-FIP			38		GACATCTTCCACGAACCCCA-TCATGCCGATCTACGC
	PoEnd-BIP			38		ATACAATCCGCCACCCGACG-GGAAGCAATGTACGAGC
	PoEnd-LF	1287	1303	17	60.28	TGCGGCGGAGTATCTCG
	PoEnd-LB	1367	1387	21	60.49	ACGAATCTCAAGGCAAGCTC
<i>Prevotella intermedia</i>	PrInt-F3	1237	1256	20	61.6	AACGACTTGAACCCACAGCT
	PrInt-B3	1432	1450	19	62.32	CCTCTTTTGAGCCCTGCT
	PrInt-FIP			41		TCAGGCTCTTCCAACTACCCG- AAGGAAGACCCCTACCGAC
	PrInt-BIP			39		GCGCATGGGCTACTTGGGAA-CCAACCTACGCACACAACG
	PrInt-LF	1296	1312	17	52.42	CACGCACACTCTTTTTC
	PrInt-LB	1370	1386	17	57.20	ACCAAAATCAGCCACGC
<i>Prevotella denticola</i>	PrDen-F3	1235	1254	20	61.94	TGAACGACTCAATCCGCGAG
	PrDen-B3	1435	1452	18	60.58	ATTCTCCCTGGCGCCTC
	PrDen-FIP			40		GCTCTCCGGATCCTTCCAGCT-CCAGGGAAGACCCCTATCG
	PrDen-BIP			38		TGGCGCACATGGGAGTACCA-GACGAGCTGGCAAGACTG
	PrDen-LF	1292	1315	24	65.62	CGCCTCGCACACTTTTCTTCA
	PrDen-LB	1384	1398	15	52.79	CGCAGTTACATCGGC
<i>Prevotella melaninogenica</i>	PrMel-F3	1235	1255	21	55.85	TGAATGATCTCAATCCTCAGT
	PrMel-B3	1433	1450	18	55.11	TCTCTTTAGTGCCTCAC
	PrMel-FIP			40		CTGGGTCTTCCAACCTACCT- AAAGAAAGACCCATATCGCT
	PrMel-BIP			42		ACTTGGGAATATCAGAACAACC-GATGAACCTGCAAGACTGC
	PrMel-LF	1292	1312	21	60.02	CACGAACGCTCTTCTTCTCA
	PrMel-LB	1384	1408	25	65.5	CGTAGCTACATCGGTTCCGGTTG

が存在しない、あるいは存在しても量が少なく検出することができないということが考えられ、継続してサンプルの濃縮方法、検出感度の向上など検討を行う予定である。

#### <引用文献>

- ① 星野倫範, 口腔ケアでは細菌学的に何を標的とするべきか?-脳性麻痺患者の唾液中細菌叢の群集解析などで得られた知見から-, 2015, 日本口腔ケア学会雑誌. 9(1):5-11.
- ② Kondo Y, Sato K, Nagano K, Nishiguchi M, Hoshino T, Fujiwara T, Nakayama K, Involvement of PorK, a component of the type IX secretion system, in *Prevotella melaninogenica* pathogenicity, Microbiol Immunol, 2018, 62(9):554-566.
- ③ Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG, Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 2007, 23:2947-2948.
- ④ Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms, Mol Biol Evol. 2018, 1;35(6):1547-1549.
- ⑤ Takano C, Kuramochi Y, Seki M, Kim DW, Omagari D, Sasano M, Chang B, Ohnishi M, Kim EJ, Fuwa K, Kilgore PE, Hoshino T, Hayakawa S, Molecular serotype-specific identification of *Streptococcus pneumoniae* using loop-mediated isothermal amplification, Sci Rep. 2019, 27;9(1):19823.
- ⑥ Lee J, Yoon Y, Kim EJ, Lee D, Baek Y, Takano C, Chang B, Iijima T, Kilgore PE, Hayakawa S, Hoshino T, Kim DW, Seki M, 23-valent polysaccharide vaccine (PPSV23)-targeted serotype-specific identification of *Streptococcus pneumoniae* using the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method, PLoS One. 2021, 16(2): e0246699.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	荻原 孝  (OGIHARA Takashi)  (10705247)	明海大学・歯学部・講師   (32404)	
研究分担者	大岡 貴史  (OOKA Takafumi)  (30453632)	明海大学・歯学部・教授   (32404)	

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