

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：27102

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 平成 22 年度～平成 24 年度

課題番号：22592341

研究課題名（和文） 生菌・死菌の区別が可能な新しい定量的口腔細菌検出法の開発

研究課題名（英文） Development of discriminative and quantitative detection method for live and dead oral bacteria

研究代表者 吉田明弘 (YOSHIDA, AKIHIRO)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：20364151

## 研究成果の概要（和文）：

ヒトう蝕細菌である *Streptococcus mutans* および *Streptococcus sobrinus* を標的とした生菌・死菌の区別が可能な定量検出系を開発・評価した。最初に、*S. mutans* および *S. sobrinus* に特異的な遺伝子領域を検索し、その領域より *S. mutans* および *S. sobrinus* の特異プライマーを設計した。次に、そのプライマーの特異性を評価するため、各種口腔細菌の染色体 DNA を精製、鋳型 DNA として設計したプライマーを用いた PCR 法による特異性の評価を行った。次に、オートクレーブで加熱殺菌を行った死菌を生菌に加えたものおよび死菌非添加のサンプルについて、PCR 阻害剤であるプロピジウムモノアザイド(PMA)を添加し、これら両群間における PCR による DNA 増幅に違いがみられないことを確認した。次に、唾液・歯垢に前述の死菌を加え、PMA で処理し、遺伝子増幅に差がみられないことを確認した。以上のことから、PMA は PCR において死菌特異的に遺伝子増幅の阻害を行い、生菌特異的に遺伝子増幅を行うことおよび歯垢・唾液等の臨床検体中でも PCR による増幅阻害が起こらないことが明らかになった。また、同じく PCR 阻害剤であるエチジウムモノアザイド(EMA)を用いたところ、生菌への為害性があることが明らかになったこと、PMA 添加／非添加の *S. mutans* および *S. sobrinus* を寒天培地に培養して、用いた濃度で PMA が同菌の生死に影響を与えないことが明らかになり PMA を使用することの優位性が確認された。また、これらの結果から、PMA は口腔内細菌の生死を区別した検出に応用可能であることが明らかになった。そこで、この系を用いてう蝕のない患者の歯垢と唾液中の *S. mutans* あるいは *S. sobrinus* の生菌数の相関を調べたところ、相関がみられたが、う蝕病巣である軟化象牙質と唾液の同菌の生菌数の相関を調べたところ、相関が認められなかった。以上のことから、う蝕の病巣の生菌数は唾液には反映されないことが明らかになった。

## 研究成果の概要（英文）：

*Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* are associated with the development of dental caries in humans. However, previous diagnostic systems are unsuitable for monitoring viable cell numbers in oral specimens. Assessing the relationship between the numbers of viable and dead bacterial cells and oral status is important for understanding oral infectious diseases. Propidium monoazide (PMA) has been reported to penetrate dead cells following membrane damage and to cross-link DNA, thereby inhibiting DNA amplification. In the present study, we established an assay for selective analysis of two viable human cariogenic pathogens, *S. mutans* and *S. sobrinus*, using PMA combined with real-time PCR (PMA-qPCR). We designed species-specific primer sets for *S. mutans* and *S. sobrinus*, generated standard curves

for measuring cell numbers, and evaluated the dynamic range of the assay. To determine the effectiveness of the assay, PMA was added to viable and autoclave-killed cell mixtures. In addition, we applied this assay to analyze viable cell numbers in oral specimens. Finally, we analyzed the usefulness of this assay for *in vitro* oral biofilm analysis. PMA treatment effectively prevented DNA amplification from dead cells. No amplification of DNA from dead cells was observed in these organisms. A significant correlation was found between the number of viable *S. mutans* cells in saliva and that in plaque among caries-free patients, whereas no correlation was observed between saliva and carious dentin. The total and viable cell numbers in caries-positive saliva were significantly higher than those in caries-free saliva. We applied PMA-qPCR for monitoring viable *S. mutans* cell numbers *in vitro* in planktonic cells and oral biofilm treated with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). In planktonic cells, the number of viable cells decreased significantly with increasing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration, whereas only a small decrease was observed in biofilm cell numbers. PMA-qPCR is potentially useful for quantifying viable cariogenic pathogens in oral specimens and is applicable to oral biofilm experiments. This assay will help to elucidate the relationship between the number of viable cells in oral specimens and the oral status.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成 23 年度	900,000	270,000	1,170,000
平成 24 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 社会系歯学

キーワード：口腔細菌、生菌、死菌、qPCR、定量検出

#### 1. 研究開始当初の背景

歯垢や唾液等の口腔内試料からの細菌検出法として、1. 顕微鏡を用いた方法、2. 培養法、3. 酵素活性法、4. 免疫学的方法、5. 分子生物学的方法などが用いられてきたが、細菌の生死を区別する方法は皆無であった。

近年、口腔細菌の検出にはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法をはじめとした、分子遺

伝学的方法を用いたものが多く研究されてきた経緯があるが、本方法の最大の欠点は生菌・死菌を区別できないことである。また、培養法も生菌のみを定量するものであり、死菌を定量するものではないため、生菌・死菌を区別する定量系ではない。死菌に生物学的活性はないが、その細胞膜は内毒素という強い病原性物質を含み、生菌同様歯周炎の発症に関与していることが考え

られるが、死菌の病態への関与についてはこれまで研究されてこなかった経緯がある。このように、口腔細菌の検出系において、生菌・死菌の区別が可能で、かつ定量的に細菌を検出する方法はこれまでほとんど発表されてこなかった。また、これまで生菌・死菌を区別した細菌定量系がなかったため、生菌・死菌を区別したそれぞれの細菌量と病態との関係についての報告も国内外を問わず皆無である。例えば、これまでは生菌・死菌を区別することなく、一緒にして歯周病細菌の定量値と病態の指標である歯周ポケット、あるいはアタッチメント・レベルとの関係について議論されてきた。また、歯周病細菌と歯周炎における血液生化学データなど臨床検査値との相関は調べられてきたが、生菌・死菌を区別した相関は調べられてこなかった。

このように生菌・死菌を区別して病態との関連性を解析することは非常に重要なことでありながら、その技術的困難性により行われてこなかった。

## 2. 研究の目的

生菌と死菌の区別が可能で、かつ口腔細菌の定量的検出が可能で、リアルタイム PCR 法および PCR 阻害剤を用いた、口腔細菌の検出系を開発する。

## 3. 研究の方法

- ①生菌・死菌を区別した歯周病細菌の定量検出系の開発
- ②口腔細菌を用いた同定量系の評価
- ③口腔試料を用いた、生菌・死菌を区別した歯周病細菌の定量
- ④口腔試料を用いた、生菌・死菌を区別した歯周病細菌の定量値と歯周病の病態との

関連についての解析

## 4. 研究成果

ヒト口腔細菌である *Streptococcus mutans* および *Streptococcus sobrinus* を標的とした生菌・死菌の区別が可能で定量的検出系を開発・評価した。最初に、*S. mutans* および *S. sobrinus* に特異的な遺伝子領域を検索し、その領域より *S. mutans* および *S. sobrinus* の特異プライマーを設計した。次に、そのプライマーの特異性を評価するため、各種口腔細菌の染色体 DNA を精製、鋳型 DNA として設計したプライマーを用いた PCR 法による特異性の評価を行った。次に、オートクレーブで加熱殺菌を行った死菌を生菌に加えたものおよび死菌非添加のサンプルについて、PCR 阻害剤であるプロピジウムモノアザイド(PMA)を添加し、これら両群間における PCR による DNA 増幅に違いがみられないことを確認した。次に、唾液・歯垢に前述の死菌を加え、PMA で処理し、遺伝子増幅に差がみられないことを確認した。以上のことから、PMA は PCR において死菌特異的に遺伝子増幅の阻害を行い、生菌特異的に遺伝子増幅を行うことおよび歯垢・唾液等の臨床検体中でも PCR による増幅阻害が起こらないことが明らかになった。また、同じく PCR 阻害剤であるエチジウムモノアザイド(EMA)を用いたところ、生菌への為害性があることが明らかになったこと、PMA 添加/非添加の *S. mutans* および *S. sobrinus* を寒天培地に培養して、用いた濃度で PMA が同菌の生死に影響を与えないことが明らかになり PMA を使用することの優位性が確認された。また、これらの結果から、PMA は口腔内細菌の生死を区別した検出に応用可能であることが

明らかになった。そこで、この系を用いてう蝕のない患者の歯垢と唾液中の *S. mutans* あるいは *S. sobrinus* の生菌数の相関を調べたところ、相関がみられたが、う蝕病巣である軟化象牙質と唾液の同菌の生菌数の相関を調べたところ、相関が認められなかった。以上の事から、う蝕の病巣の生菌数は唾液には反映されないことが明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

Masakiyo, Y., Yoshida, A., Shintani, Y., Takahashi, Y., Ansai, T. and Takehara, T.: The identification of genes specific to *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* using genomic subtractive hybridization. *Anaerobe* 16: 265-269, 2010.

Masakiyo, Y., Yoshida, A., Takahashi, Y., Shintani, Y., Awano, S., Ansai, T., Sawayama, S., Shimakita, T. and Takehara, T.: Rapid LED-based fluorescence microscopy distinguishes between live and dead bacteria in oral clinical samples. *Biomed Res.* 31: 21-26, 2010.

Takahashi, Y., Yoshida, A., Nagata, E., Hoshino, T., Oho, T., Awano, S., Takehara, T. and Ansai, T.: *Streptococcus anginosus* L-cysteine desulphydrase gene expression is associated with abscess formation in BALB/c mice. *Molecular Oral Microbiol.* 26 : 221-227, 2011.

Takahashi, Y., Yoshida, A., Nagayoshi, M., Kitamura, C., Nishihara, T., Awano, S. and Ansai, T.: Enumeration of visible *Enterococcus faecalis*, a predominant apical periodontitis pathogen, using propidium monoazide and quantitative real-time Polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* 55: 889-892, 2011.

Yoshida, A., Ennibi, O-K., Miyazaki, H., Hoshino, T., Hayashida, H., Nishihara, T., Awano, S. and Ansai, T.: Quantitative discrimination of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* highly leukotoxic

JP2 clone form non-JP2 clones in diagnosis of aggressive periodontitis. *BMC Infectious Dis.* 12: 253, 2012.

吉田明弘 : 歯周病と細菌検査. 九州歯会誌 65: 169-178, 2012.

[学会発表] (計 14 件)

高橋優介、吉田明弘、新谷泰之、栗野秀慈、安細敏弘 : マウス膿瘍形成における *Streptococcus anginosus*  $\beta$  C-S liase 遺伝子の発現解析. 第 70 回九州歯科学会総会 (北九州) (2010) (九州歯会誌 64 : 139, 2010) .

高橋優介、吉田明弘、栗野秀慈、安細敏弘 : 生菌・死菌を区別した根管細菌の定量検出法の開発. 第 59 回日本口腔衛生学会・総会 (新潟) 2010 年 10 月 7-8 日.

正清義朗、吉田明弘、高橋優介、安細敏弘 : *Streptococcus mutans* の生菌と死菌/損傷菌を区別した定量検出法の開発. 第 59 回日本口腔衛生学会・総会 (新潟) 2010 年 10 月 7-8 日.

吉田明弘、高橋優介、長田恵美、於保孝彦、栗野秀慈、安細敏弘 : マウス実験膿瘍における *Streptococcus anginosus* *lcd* 遺伝子の発現解析. 第 59 回日本口腔衛生学会・総会 (新潟) 2010 年 10 月 7-8 日.

Yoshida, A., Takahashi, Y., Nagata, E., Hoshino, T., Oho, T., Awano, S. and Ansai, T.: *Streptococcus anginosus*  $\beta$ C-S lyase gene expression and experimental abscess formation. 第 88 回 IADR (July 14-17, 2010, Centre Convencions Internacional Barcelona).

Dewake, N., Yoshida, A., Takahashi, Y., Awano, S., Miyazaki, H. and Ansai, T.: Novel qualitative detection method for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2. 58th JADR (Nov. 20-21, 2010).

吉田明弘 歯周病と細菌検査 第 71 回九州歯科学会総会 (北九州) シンポジウム 2011

安永 愛、吉田明弘、仁木満美子、山本裕司、安細敏弘 : *Streptococcus gordonii* と共培養時に *Streptococcus mutans* に発現するタンパク質の解析. 日本細菌学会地方会 2011 8 月 (門司) .

Yasunaga, A., Yoshida, A., Masakiyo, Y., Morikawa, K., Maki, K., Soh, I., Awano, S. and Ansai, T.: Enumeration of viable

cariogenic pathogens assessed by PMA-based real-time PCR. JADR (広島) 2011

吉田明弘、安永愛、仁木満美子、山本裕司、西原達次、中村卓、安細敏弘

*Streptococcus gordonii* と共培養時に *Streptococcus mutans* に発現するタンパク質のプロテオーム解析

第 85 回日本細菌学会総会 平成 24 年 3 月 27 日-29 日 長崎

安永 愛、吉田明弘、正清義朗、森川和政、牧憲司、邵 仁浩、栗野秀慈、安細敏弘：生菌選択的なう蝕細菌定量法の開発と小児口腔内試料の解析。第 61 回日本口腔衛生学会総会(横須賀) (2012)

吉田明弘、宮崎秀夫、林田秀明、栗野秀慈、安細 敏 弘 : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ロイコトキシン産生/非産生株の選択的定量検出法の開発。第 61 回日本口腔衛生学会総会 (横須賀) (2012)

安永 愛、吉田明弘、西原達次、安細敏弘：歯面初期定着菌群との共培養時における *Streptococcus mutans* 抗酸化タンパク質の機能解析。第 54 回日本歯科基礎医学会 (郡山) (2012) .

Yoshida, A., Yasunaga, A., Niki, M., Yamamoto, Y., Nishihara, T. and Ansai, T.: Proteome analysis of *Streptococcus mutans* biofilms co-cultured with *Streptococcus gordonii*. 6th ASM Conference on Biofilms. Miami, Florida, Sept. 29-Oct. 4., 2012.

〔図書〕 (計 4 件)

栗野秀慈、吉田明弘、邵 仁浩、安細敏弘：必修 臨床研修歯科医ハンドブック (平成 22 年度版)、医歯薬出版、東京、2010.

Yoshida, A. and Ansai, T.: DHEAS and periodontal status in older Japanese. In: DHEA in Human Health and Aging, ed: Ronald Ross Watson, CRC Press, Taylor & Francis Group LLC., 263-276, 2012.

Yoshida, A. and Ansai, T.: Microbiological Diagnosis for Periodontal Diseases. In: Periodontal Diseases - A Clinician's Guide (Ed. by Jane Manakil), InTech, 55-66, 2012.

Yoshida, A., Niki, M., Ansai, T. and Nakayama, K.: Oral disease and hydrogen sulfide production by oral bacteria (eds. Derin

Adebayo and Aramide Okafor ), Nova Science Publishers, New York, USA, 131-145, 2013

〔産業財産権〕  
○出願状況 (計 1 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 1 件)

名称：口腔細菌の迅速検出  
発明者：吉村満美子、中山浩次、大原直也、吉田明弘、竹原直道  
権利者：吉田明弘  
種類：  
番号：特許第 4792585 号  
取得年月日：平成 23 年  
国内外の別：国際

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www2.kyu-dent.ac.jp/dept/oral-health/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 明弘 (YOSHIDA, AKIHIRO)  
九州歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 20364151

(2) 研究分担者

安細 敏弘 (ANSAI, TOSHIHIRO)  
九州歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 2036415180244789

邵 仁浩 (SOH, INHO)  
九州歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 10285463

峰岡 哲郎 (MINEOKA, TETSURO)  
九州歯科大学・歯学部・その他  
研究者番号: 50571402

竹原 直道 (TAKEHARA, TADAMICHI)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 00038879

栗野 秀慈 (AWANO, SHUJI)

九州歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号:20301442

(3)連携研究者  
( )

研究者番号: