

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12058

研究課題名(和文) 健常バイオマーカーに着目した糖尿病検査キットの開発

研究課題名(英文) Development of the clinical kit for the assessment of diabetes using a healthy biomarker

研究代表者

小林 平 (KOBAYASHI, Taira)

日本大学・松戸歯学部・准教授

研究者番号：20267107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、*Corynebacterium matruchotii* (C.m)を口腔試料から分離するために選択培地を開発した。C.mは糖尿病に罹患していない健常者と比較して、糖尿病患者の歯周ポケットから多く検出された。本研究で開発した糖尿病罹患を推察できる検査キットは、臨床の場で応用可能であり、糖尿病診断において大いに貢献できることが示唆された。C.mのglucose濃度による発育の違いを調査した結果、本菌の発育能は濃度依存的に増加する傾向を示した。糖尿病患者のGCF中では高いglucose環境が維持されているため、C.mが発育する環境として適しているものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は、歯周病などと同様に沈黙の病気(silent disease)であり、自覚症状に乏しい慢性疾患で本人が自覚していないことや、患者自身が糖尿病を患っていることを隠すケースが多く存在することが指摘されている。しかしながら、歯科医師は糖尿病の診断を下すことは出来ないし、歯科治療の一環で血液検体や尿検体を採取して行われる臨床検査の実施することは難しい。そのため、本研究は非侵襲的に得られる口腔試料を用いた糖尿病のスクリーニング検査キットを開発することを目的とした。

研究成果の概要(英文)：In recent years, it has been paid the attention to the influence that diabetes (lifestyle-related disease) gives to oral cavity. The aim of this study was to development of the clinical kit for the assessment of diabetes using a biomarker. This study was approved by the Ethics Committee of Nihon University School of Dentistry, at Matsudo (EC17-019).

A selective medium for the isolation of *Corynebacterium matruchotii* (C.m) in oral cavities was developed in this study. CFUs of C.m in the periodontal pocket of the diabetics were significantly higher than that in healthy subjects, non-diabetics. It was indicated that the simple clinical kit for the assessment of diabetes using culture method developed in this study was useful clinically, and can greatly contribute to the diabetes diagnosis. Moreover, after investigating of C.m growth at different glucose concentrations, it was suggested that C.m preferred the high glucose environment such as the periodontal pockets of diabetics.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：糖尿病 検査キット 検査 歯周病 *Corynebacterium* 選択培地

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、歯科界において生活習慣病である糖尿病によって及ぼされる口腔への影響が解明されてきている。また、糖尿病患者が易感染性であることは一般にコンセンサスが得られており、実際に申請者らが臨床で遭遇する糖尿病患者は、重症の感染症を併発しているケースが多い。易感染性の問題に加え、糖尿病罹患は、歯科領域において治療の適応範囲が制限されることや歯科治療時に注意を要する事項が多々にしてある。特に抜歯などの観血的処置に関しては注意が必要となり、コントロールされていない糖尿病患者のインプラント治療は禁忌となっている。歯周病の診断は、歯科で日常的に行われている検査で判断することが可能であるが、糖尿病の診断は、一般の歯科医院では限られた時間で行われる問診によって患者自身から得られた情報にしか頼る術はない。しかし、糖尿病は歯周病などと同様に沈黙の病気 (silent disease) であり、自覚症状に乏しい慢性疾患で本人が自覚していないことや、患者自身が糖尿病を患っていることを隠すケースが多く存在することが指摘されている。しかしながら、歯科医師は糖尿病の診断を下すことは出来ないし、歯科治療の一環で血液検体や尿検体を採取して行われる臨床検査の実施することは難しい。その様な中、近年、次世代シーケンサーなどによるメタゲノム解析により、ヒト口腔細菌叢の全貌が明らかにされつつある。健常者と糖尿病患者の歯肉縁下細菌叢を比較した研究によると、*Corynebacterium matruchotii* (*C.m*) が、健常者と比較して糖尿病患者の歯肉縁下では顕著に多かったと報告した。

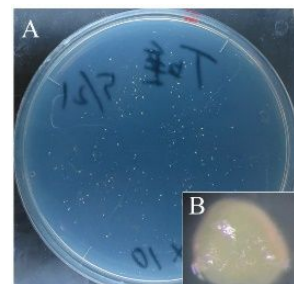
2. 研究の目的

そこで申請者らは、健常者の歯肉縁下細菌叢で優勢な *C.m* に着目し、本細菌を糖尿病に対する健常マーカーとして捉え、培養法を応用した半定量試験による簡易で安価かつ検出感度が高く、非侵襲的に得られる口腔試料を用いた糖尿病のスクリーニング検査キットを開発することを目的とした。これにより単に学術的意義だけではなく、エビデンスに裏付けされた臨床応用が可能となり、歯科治療における質の向上と補助に寄与するものと思われる。

3. 研究の方法

(1) 本研究は、ヒトから採取された歯肉溝滲出液 (GCF) を用いるため、日本大学松戸歯学部倫理審査委員会に本研究の申請を行い、承認を得ている。なお、本研究で対象となる被験者は、試料採取時に2ヶ月間抗菌薬の服用がない者とした。(承認番号 EC17-019)

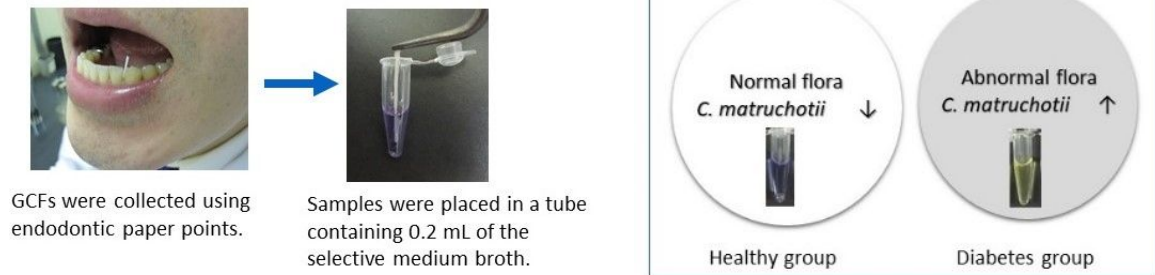
(2) 糖尿病診断に有用な健常バイオマーカーとなる *C.m* 分離用選択培地の開発を行った。申請者らは、口腔 *Corynebacterium* 分離用選択培地 (Tsudukibashi et al., J Microbiol Methods, 104:67-71, 2014.) を以前開発した。この研究結果から、ヒト口腔における主な *Corynebacterium* 属は、*C. durum* (*C.d*) および *C.m* であった。ヒト鼻咽腔および皮膚から分離される *C. diphtheriae*, *C. xerosis*, *C. pseudodiphtheriticum* は検出されなかった。本選択培地はこれら全ての菌種を完全に発育させ、これら以外の口腔常在菌の発育は全く認められなかった。そこで本研究において、代表的な *Corynebacterium* 属に対して抗菌薬感受性試験を行った結果、*C.m* は他の *Corynebacterium* 属と比較して、局所消毒薬の Acriflavin に対して低い感受性を示した。最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した結果、*C.m* が 25 µg/mL であったのに対して、他の *Corynebacterium* 属は 6 µg/mL 以下であった。以前開発した口腔 *Corynebacterium* 分離用選択培地に Acriflavin を 7.5 µg/mL 添加したところ、*C.m* のみを選択的に発育させることに成功した。



開発した *C.m* 分離用選択培地
A. 唾液試料接種・培養3日後
B. *C.m* コロニー拡大像

(3) 歯周ポケットが 3mm 以内でエックス線画像および肉眼的に異常所見が認められない者を健康な歯周組織をもつ健常者(歯周健常者)、明らかに糖尿病の既往がなく歯周ポケットが 5mm 以上の部位を有している者を歯周炎患者、歯周ポケットが 5mm 以上の部位を有しており空腹時血糖値 (FBS) 140mg/dl 以上、および HbA1c (NGSP 値) 6.9%以上の者を糖尿病罹患歯周炎患者と分類した。歯周健常者 20 名、歯周炎患者 20 名および糖尿病罹患歯周炎患者 13 名の各被験者から GCF を採取し、本研究で開発した *C.m* 分離用選択培地に接種・塗抹後、好氣的条件下にて 3 日間培養を行った。培養後に選択培地に形成された集落から CFU (colony forming unit) を算定した。菌種同定は本研究で開発した *C.m* 特異的プライマーを用いた PCR 法にて行った。統計的分析は Kruskal-Wallis ANOVA を用いた。

(4) 糖尿病罹患を察知できるスクリーニング検査キットの開発を行った。糖尿病罹患を察知できる検査キットの培地組成は、本研究で開発した糖尿病診断に有用な健常バイオマーカー菌である *C.m* 分離用選択培地から寒天を除いた選択液体培地に、指標となる健常バイオマーカー菌が分解して酸を産生することが可能な炭水化物と pH 指示薬である Bromocresol purple を添加したものとした。*C.m* が効率良く酸を産生する炭水化物を調査した結果、Sucrose が最適なことが判明した。これらを含んだ選択液体培地を 0.2mL の PCR チューブに 20 μ L 分注し、臨床で採取した GCF が浸み込んだペーパーポイントを挿入し、図のような手技を用いて糖尿病診断検査キットで培養を行い、健常バイオマーカー菌 *C.m* の糖分解能を応用した pH 指示薬による色調変化によって、図のイメージの様な基準値を設定したカラーチャートにしたがって判定するようにした。本方法を用いて、糖尿病診断に有用な健常バイオマーカー菌である *C.m* を効果的に検出できるように最適な培養条件および正確なカラーチャートによる定量の判定を調査した。



選択液体培地の組成

HI Sucrose Fosfomycin Acriflavine Amphotericin B Bromocresol purple

(5) 開発した糖尿病罹患を察知できるスクリーニング検査キットを用いて、糖尿病患者 30 名と糖尿病に罹患していない健常者 30 名から GCF をペーパーポイントにて採取して比較検討を行った。

(6) 糖尿病診断に有用な健常バイオマーカー菌である *C.m* の glucose 濃度による発育の違いを調査するために、HI 半流動培地に glucose を 0%、0.1%、および 1.0% 添加したものを試験管に分注し、白金線にて BHI 培養液にて前培養した *C.m* を空気が入らないように手早く接種し、37、24 時間、好気培養を行った。培養後、それぞれの試験管内における発育の違いを観察することにより、比較検討を行った。

4. 研究成果

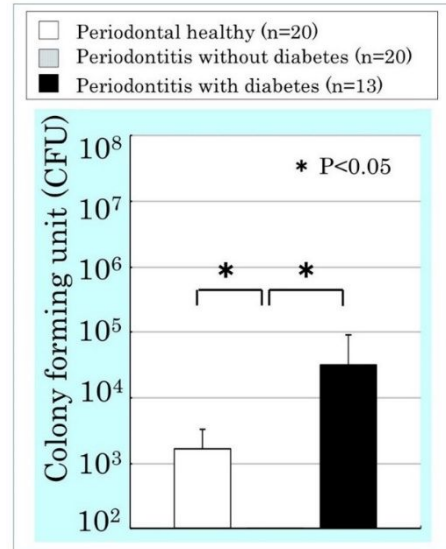
(1) 歯周健常者、歯周炎患者および糖尿病罹患歯周炎患者の GCF 中における *C.m* 数を図 1 に示す。歯周炎患者(5.0 CFU)と比較して、歯周健常者(1.62×10^3 CFU)および糖尿病罹患歯周炎患者(3.2×10^4 CFU)において *C.m* は有意に多く検出された。さらに、歯周健常者と比較して、糖尿病罹患歯周炎患者において *C.m* は有意に多く検出された。

(2) 開発した糖尿病診断検査キットを用いて、健常バイオマーカー菌 *C.m* の Sucrose 分解能を応用した pH 指示薬 Bromocresol purple による色調変化を経時的に観察したところ、 10^4 CFU 以上の *C.m* を接種したものは、図 2 のように約 24 時間の培養で紫から黄色にキットの培養液が変色した。図 1 の結果を踏まえて、本キットに試料を接種・培養後、24 時間で黄色に変色したものを糖尿病の疑いがあるものと規定した。

(3) 開発した検査キットを用いて、糖尿病患者と健常者を調査した結果を表 1 に示す。全ての糖尿病患者が 24 時間後に本検査キットが紫から黄色に変化したのに対し、全健常者は紫色のままであった。そのため、本検査キットは糖尿病罹患を察知できるスクリーニング検査として有用であることが示唆された。

(4) HI 半流動培地を用いて、*C.m* の glucose 濃度による発育の違いを調査した結果を図 3 に示す。*C.m* の発育能は glucose 濃度依存的に増加する傾向を示した。また、酸素濃度が低い培地下層部までの発育が認められた。Kjellman によると健常者の GCF 中の glucose 濃度は約 0.01%であったのに対し、糖尿病患者では 0.1%であったと報告している。糖尿病患者の GCF 中は高い glucose 環境が維持されているため、*C.m* が発育する環境として適しているものと考えられた。また、低酸素状態である歯周病患者の深い歯周ポケットにおいても、糖尿病患者であれば本菌が生息するのに適した環境となり得ることが推察された。

図 1



No. of <i>C. matrucotii</i> (CFU)		
Periodontal healthy (n=20)	Periodontitis without diabetes (n=20)	Periodontitis with diabetes (n=13)
1.62×10^3	5.0	3.2×10^4
(S.D $\pm 1.76 \times 10^3$)	(S.D $\pm 1.61 \times 10$)	(S.D $\pm 5.77 \times 10^4$)

図 2

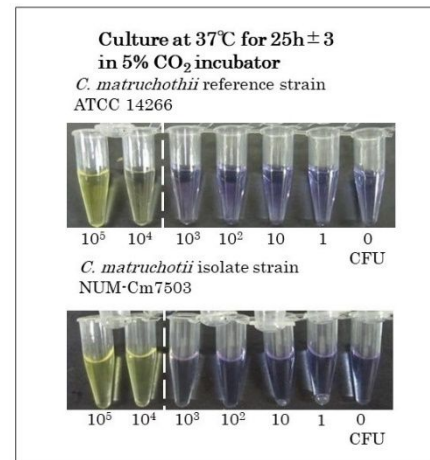


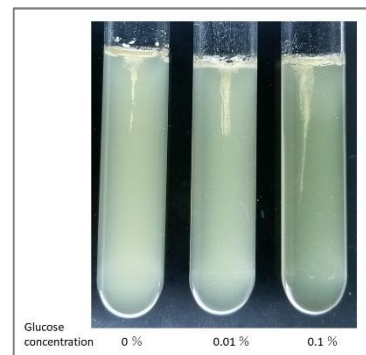


表 1

Utility evaluation of clinical kit developed in this study		
	Healthy (n=30)	Diabetes (n=30)
CFU of <i>C. matrucotii</i> by using CMSM	5.42×10^2 (S.D $\pm 1.56 \times 10^3$)	3.16×10^4 (S.D $\pm 5.71 \times 10^3$)
No. of positive samples* by using clinical kit	 0	 30

* The samples which changed from blue to yellow by acid production from sucrose, after the cultivation for 24 hours in a 5% CO₂ incubator, were defined as positive.

図 3



<引用文献>

Tsuzukibashi O、Uchibori S、Shinozaki-Kuwahara N、Kobayashi T、Takada K、
Hirasawa M、A selective medium for the isolation of *Corynebacterium* species in oral
cavities、J microbial Methods、104巻、2014、67 - 71

Kjellman O、The presence of glucose in gingival exudate and resting saliva of subjects
with insulin-treated diabetes mellitus、Swed dent、63 巻、1970、11 - 19

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 内堀 聡史、續橋 治、上里 ちひろ、高橋 佑次、玉木 大之、小峯 千明、淵上 真奈、深津 晶、小林 平、村上 洋、福本 雅彦	4. 巻 12
2. 論文標題 歯周組織の健常マーカーの指標となる得る細菌の検索	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本口腔検査学会雑誌	6. 最初と最後の頁 3-10
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上里 ちひろ、内堀 聡史、田中 孝明、後藤 治彦、北川 剛至、小林 平、續橋 治
2. 発表標題 インプラント周囲炎で優勢なEubacterium属のMultiplex PCR法
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第128回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内堀 聡史、上里 ちひろ、田中 孝明、後藤 治彦、村上 洋、小林 平、續橋 治
2. 発表標題 最終補綴装置の作製時期決定に有用な細菌検査法の確立
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第128回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内堀 聡史、續橋 治、小林 平、會田 雅啓
2. 発表標題 Slackia exigulaはインプラント周囲炎の病的マーカーとなり得る
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会
4. 発表年 2017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	續橋 治 (TSUZUKIBASHI Osamu) (80333110)	日本大学・松戸歯学部・講師 (32665)	