

令和元年6月17日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17384

研究課題名(和文) 健全な歯周組織の指標となる細菌の検出キットの開発

研究課題名(英文) Development of an applicable clinical kit which are useful for an indicator of the healthy periodontal tissue

研究代表者

内堀 聡史 (UCHIBORI, Satoshi)

日本大学・松戸歯学部・助手(専任扱)

研究者番号：90706508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年の研究において、*Rothia dentocariosa* (R.d) という細菌が健全口腔細菌叢を反映する重要な指標となり得ることが示唆されている。そこで申請者が過去に開発したR.d選択培地の組成を改良し、臨床の場で簡便にR.dを検出し歯周病学的に健全な細菌叢を計る検出キットの開発を行った。歯周炎患者、歯肉炎患者、および健常者から歯肉溝滲出液を採取し、開発した検出キットを用いたところ、pH指示薬による色調変化によってR.dの菌数を正確に定量可能であることが確認された。本検出キットは臨床において健全な歯周組織状態をモニタリングすることが可能であり、診断・治療・予後の判定に活用できると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの歯周病細菌検査のターゲットは、特にレッドコンプレックスと呼ばれる *Porphyromonas gingivialis*、*Tannerella forsythia*、*Treponema denticola*を代表とする歯周病原菌の有無や菌量を調べるものが主流であるが、実際の歯周病の状態と一致しない場合も多く、臨床的意義に疑問を持つ声もある。このような面から、歯周病患者の細菌群と比較して健常者で顕著に認められる細菌を健康な歯周組織のバイオマーカーとして捉え、その変動を指標とすることにより、臨床における診断・治療・予後の判定、さらに歯周病のリスク判定に活用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recent some studies reported that *Rothia dentocariosa* (R.d) dominated the health-associated subgingival plaque communities. The aim in this study was to develop an easily applicable clinical kit for estimating the level of R.d in gingival crevicular fluid (GCF) samples. A clinical kit was developed using the selective medium broth made from an improved composition, i. e. addition of bromocresol purple, of the selective medium agar for the isolation of R.d. For examination of clinical efficacy, GCF samples were collected from periodontal healthy persons and periodontal patients. The result obtained by using this kit was compared with that of selective medium agar. The growth of oral bacteria other than R.d was markedly inhibited in this clinical kit. The results obtained by using this clinical kit were similar to that of selective medium agar. Since this clinical kit can accurately estimate the level of R.d in GCF samples, it will be useful for the clinical.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：歯周病 簡易キット 口腔細菌 選択培地 *Rothia*属

1. 研究開始当初の背景

申請者は以前から日和見感染の起因菌として着目されていた *Rothia dentocariosa* (*R. dentocariosa*) について研究を進め、本菌の分離用選択培地を既に開発している。本菌は近年、次世代シーケンサーによるメタゲノム解析によって、歯周病罹患者の歯肉縁下細菌叢と比較し、歯周病学的に健常な者の細菌叢に有意に多く検出されることが報告されている（引用文献、 、 ）。これは、歯周病学的に健常な細菌叢の理想的なバランスを崩した結果、*R. dentocariosa* が歯周病罹患者歯肉溝の細菌叢で相対的な減少が認められた可能性が考えられる。従って、全菌体に占める *R. dentocariosa* の割合を調査することは、歯周病学的に健常な細菌叢をはかる指標となり得ることが示唆された。以前、本菌の分離用選択培地を用いた予備実験を行った結果、歯周炎群、歯肉炎群と比較して健常群で *R. dentocariosa* が有意に高率で検出された（図 1）。このことにより、*R. dentocariosa* が歯周病学的に健常なバイオマーカーとして優れていることが分かった。

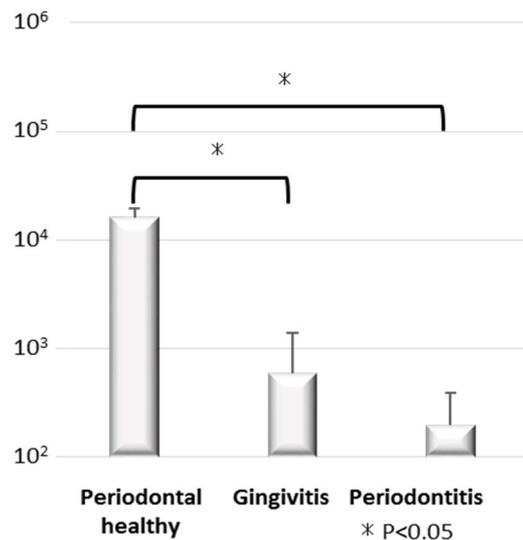


図 1 臨床検体における *R. dentocariosa* の検出比率

2. 研究の目的

本研究の目的は歯肉縁下細菌叢に占める *R. dentocariosa* の割合を調査し、本菌体を歯周病学的に健常な細菌叢をはかる指標とした簡易な検出キットを開発することである。最終的には、チェアサイドで使用可能な、簡易でかつ精度の高い培養法を基盤とした *R. dentocariosa* の検出キットを開発する。この検出キットは、患者の現時点での口腔細菌叢のバランスが問題の無いものなのか、病的であるかを判定することが可能なもので、さらに今後の歯周組織病態の推移を予測できるツールとなる可能性がある。また、最終補綴装置の装着時期、インプラント治療のリコール間隔の決定、およびインプラント周囲炎治療後の予後判定に応用可能であると考えている。

3. 研究の方法

(1) 健常な歯周組織の指標となる細菌の検出キットは pH 指示薬の色調変化により判定するために、以前開発した *R. dentocariosa* 選択培地(引用文献)の組成の改良を行った。 *R. dentocariosa* が培地中に含まれている高濃度スクロースを分解し酸を産生する性状を応用し、pH 指示薬であるプロモクレゾールパープル (BCP) を添加した選択寒天培地を作製した(表

1)。改良型 *R. dentocariosa* 選択寒天培地を使用し 37℃、3 日間好気培養、総菌用培地として Heart Infusion 寒天培地を使用し 37℃、2 日間ローソク培養を行い、*R. dentocariosa* の回収率、および、その他口腔内優勢菌種の抑制率を算定した。

(2)検出キットの組成は、改良型 *R. dentocariosa* 選択寒天培地に寒天を除いた選択液体培地とし、0.5ml チューブに本選択液体培地を 0.2ml 分注したものを検出キットの試作品とした。作製した選択液体培地に 10 倍段階希釈した標準株 *R. dentocariosa* JCM3067、および分離株 *R. dentocariosa* NUM-Rd6018 を接種し、37℃、25 時間好気培養を行った。培養後、*R. dentocariosa* の糖分解能を応用した BCP による色調変化により、基準値と菌数を設定したカラーチャートを作製した。

(3) 歯周病学的に健常な者、歯肉炎罹患患者、歯周炎罹患患者の歯肉溝滲出液を採取した(表 2)。対象者は本学部付属病院に来院した患者とし、歯肉溝滲出液は歯周ポケット内にペーパーポイントを 10 秒間挿入し採取した。なお、歯周病学的に健常な者は

表 1 改良型 *R. dentocariosa* 選択寒天培地 (Modified-RDSM)

HI
Sucrose
Lincomycin
Colistin
Acriflavine
Bromocresol purple
Agar

表 2 対象者と臨床所見

Subject	Sex	Age	Probing depth(mm)
Periodontal healthy (n=30)	male 14	30.2	2.41
	female 16	(rage: 25-43)	(range: 2-3)
Gingivitis (n=15)	male 9	22.8	3.6
	female 6	(rage: 21-25)	(range: 3-5)
Periodontitis (n=30)	male 18	66.2	5.9
	female 12	(rage: 46-78)	(range: 5-9)

歯周治療を含めた歯科治療が終了し定期的にメンテナンスを受けている歯周病が認められない者、歯周病罹患患者は過去 6 カ月間歯周治療の受診歴がない患者とした。また、歯肉溝滲出液を対象としているために本学部の倫理審査委員会にて審査後、学部長の承認を得ている(承認番号 EC 15 025)。

試料を採取したペーパーポイントを 0.5ml チューブに本選択液体培地を 0.2ml 分注した検出キットに浸漬した。その一部を採取し 10 倍段階希釈を行い、改良型 *R. dentocariosa* 選択寒天培地に塗抹、拡散、37℃、3 日間好気培養後 colony-forming units を算定した。さらに、ペーパーポイントが浸漬されている検出キットは 37℃、25 時間好気培養を行った。つまり、改良型

R. dentocariosa 選択寒天培地による *R. dentocariosa* の検出比率と開発した本検査キットの結果と比較検討することにより、本検査キットの有用性と菌数の相関性の確認を行った。

4. 研究成果

改良型 *R. dentocariosa* 選択寒天培地において *R. dentocariosa* は良好な回収率得ることができ、その他の口腔内優勢な目的外菌種を抑制することができた (表 3)。

表 3 改良型 *R. dentocariosa* 選択寒天培地における *R. dentocariosa* の回収率

Strain		HI CFU/ml、 $\times 10^8$	Modified-RDSM CFU/ml、 $\times 10^8$	Recovery、 %
<i>R. dentocariosa</i>	JCM3067	1.0 \pm 0.1 ^a	0.9 \pm 0.1	85.4
	NUM-Rd6012	2.0 \pm 1.2	2.0 \pm 1.2	101.7
	NUM-Rd6014	2.1 \pm 0.7	1.9 \pm 0.7	90.3
	NUM-Rd6018	0.9 \pm 1.0	1.0 \pm 1.1	108.2
<i>R. mucilaginosa</i>	JCM10910	1.2	0.000001	< 0.0 ^b
<i>R. aeria</i>	JCM11412	0.8	0.0003	< 0.0
<i>S. salivarius</i>	HHT	3.2	0	0
<i>A. naeslundii</i>	ATCC12104	1.4	0	0
<i>N. sicca</i>	ATCC29256	2.4	0	0
<i>C. matruchotii</i>	ATCC14266	0.8	0	0

選択性は従来の選択培地を改良することでも顕著に歯肉溝浸出液中の目的外菌は抑制され、本検査キットに BCP による色調変化によって標準株 *R. dentocariosa* JCM3067、および、分離株 *R. dentocariosa* NUM-Rd6018 の菌数を正確に定量可能であることが確認された (図 2)。また、およそ 25 時間という短い培養時間で色調変化を確認することができた。

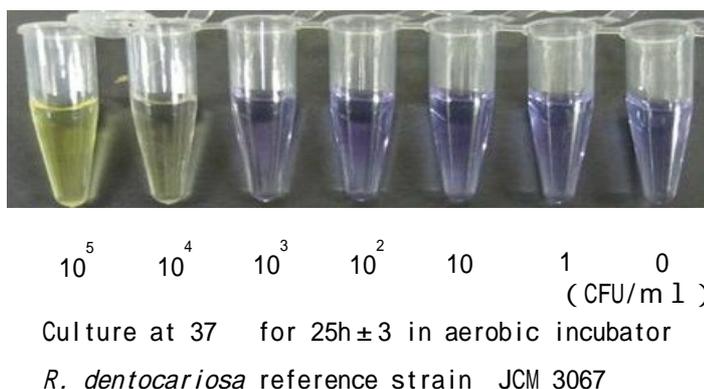


図 2 改良型 *R. dentocariosa* 選択液体培地における BCP による色調変化

臨床試料においても、本検出キットにおける *R. dentocariosa* 検出菌数と選択平板培地による *R. dentocariosa* の菌数に相関が認められたことより、菌数定量にも優れていることが確認できた(表4)。

これらの結果から、本検出キットは歯肉溝浸出液試料から *R. dentocariosa* を定量的に検出することができ、臨床において歯周組織状態を正確にモニタリングすることが可能であり、診断・治療・予後の判定に活用できると推察された。さらに培養時間がおよそ25時間であり、迅速な診断が可能であることが分かった。

表4 開発した検出キットの臨床評価

	Periodontal healthy (n=30)	Gingivitis (n=15)	Peridontitis (n=30)
CFU of <i>R. dentocariosa</i> by using modified-RDSM	1.60 × 10 ⁴ (S.D ± 3.65 × 10 ³)	5.93 × 10 ² (S.D ± 8.08 × 10 ²)	2.0 × 10 ² (S.D ± 1.89 × 10 ²)
No. of positive samples* by using clinical kit	 30	 0	 0

*、 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

<引用文献>

- Abusleme L, Dupuy AK, et al.: The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. ISME, J 7: 1016-1025, 2013.
- Kistler JO, Booth V, et al.: Bacterial community development in experimental gingivitis. PLoS ONE, 8(8):e71227, 2013.
- Zhou M, Rong R, et al.: Investigation of the effect of type 2 diabetes mellitus on subgingival plaque microbiota by high-throughput 16S rDNA pyrosequencing. PLoS ONE 8(4): e61516, 2013.
- Uchibori S, Tsudukibashi O, et al.: A novel selective medium for the isolation and distribution of *Rothia dentocariosa* in oral cavities. J Microbiol Methods 91(1): 205-207, 2012.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

- Tsuzukibashi O, Uchibori S, Kobayashi T, Umezawa K, Mashimo C, Nambu T, Saito M, Hashizume-Takizawa T, Ochiai T, Isolation and identification methods of *Rothia* species in oral cavities. J Microbiol Methods, 134, 21-26. 2017. 査読有
DOI: 10.1016/j.mimet.2017.01.005.

[学会発表](計5件)

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、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、公益社団法人 日本補綴歯科学会 第128回学術大会、2019年

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、インプラント周囲炎で優勢な *Eubacterium* 属の Multiplex PCR 法、日本補綴歯科学会 第128回学術大会、2019年

續橋治、内堀聡史、齋藤真規、桑原紀子、落合智子、Isolation method of *Scardovia wiggisiae* and relationship with adult dental caries、第91回日本細菌学会、2018年

内堀聡史、續橋治、小林平、會田雅啓、*Slackia exigua* はインプラント周囲炎の病的マーカーとなり得る、第59回歯科基礎医学会、2017年

續橋治、内堀聡史、齋藤真規、小林良喜、瀧澤智美、桑原紀子、落合智子、口臭簡易キットの開発と口臭に関わる細菌の検索、第59回歯科基礎医学会、2017年

6. 研究組織

若手研究(B)のため、研究代表者ひとりで行うものである。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。