

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：44416

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10272

研究課題名（和文）歯周炎グレード分類決定に有用な新規評価システムの構築

研究課題名（英文）Development of a Novel Evaluation System Useful for Determining Periodontitis Grading Classification

研究代表者

関根 伸一（SEKINE, SHINICHI）

大手前短期大学・歯科衛生学科・教授

研究者番号：70506344

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：令和3年度の研究では、歯周炎と強く関与するRed complex（P.g, T.d, T.f）をターゲットに、CF-PCRマイクロ流体チップを用いてマルチPCRを実施した。プライマーの最適組み合わせを見つけ、アンプリコンの増幅時間を大幅に短縮できることを示した。令和4年度の研究では、CF-PCRアレイマイクロ流体チップを作製し、複数の遺伝子を同時に増幅した。最短2'07''で増幅に成功し、POCTとして有効性を確認した。令和5年度の研究では、二重層の水滴CF-PCRチップを提案し、気泡や蒸発を最小限に抑えた。P.gのターゲット遺伝子を11分16秒以内に増幅することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、CF-PCRマイクロ流体チップを用いた歯周病菌の迅速診断法を開発し、歯周病のグレード分類決定に応用可能なポイントオブケア（POCT）検査法としての実用性を示した。令和3年度では、P.g, T.d, T.fの標的遺伝子を短時間で増幅する方法を確立し、その有効性を確認した。令和4年度では、CF-PCRアレイマイクロ流体チップを用いて複数の遺伝子を同時に迅速かつ正確に増幅できることを確認し、偽陽性の問題にも対処した。令和5年度では、二重層の水滴CF-PCRチップを提案し、気泡や蒸発の問題を最小限に抑えながら、P.gの遺伝子を11分16秒以内に増幅する技術を確立した。

研究成果の概要（英文）：In the 2021 study, multi-PCR was performed using a CF-PCR microfluidic chip targeting red complexes (P.g, T.d, and T.f), which are strongly associated with periodontitis. We found the optimal combination of primers and showed that the amplification time of amplicons can be significantly shortened. In the 2022 study, CF-PCR array microfluidic chip was fabricated and multiple genes were amplified simultaneously. Amplification was successfully achieved in as short as 2'07'', and the effectiveness of this method as a POCT was confirmed. In the FY2023 study, we proposed a bilayer water droplet CF-PCR chip to minimize air bubbles and evaporation, and succeeded in amplifying the target gene of P.g. within 11'16''.

研究分野：口腔衛生

キーワード：歯周炎グレード バイオフィルム POCT CF-PCR

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2017年に「世界歯科連盟(FDI)」および「アメリカ歯周病学会(AAP)」と「ヨーロッパ歯周病学会(EFP)」の共催によるワークショップで発表された「歯周病の新分類」では、歯周炎が4つのステージ(1~4)と3つのグレード(A~C)に分けられた。ステージは「進行度」、グレードは「進行リスク」を示す。研究開始時における日本における歯周病治療において、全歯を対象とした歯周ポケット測定や「骨吸収の評価」は行われていたが、グレードを決定する「バイオフィームと組織の破壊程度」、「炎症マーカー」および「バイオマーカー」の評価は十分行われているとはいえなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、「バイオフィームの高病原化」と「バイオマーカー」を簡易に評価できる新規システムを構築し、歯周炎のグレード判定に応用することを目的とした。

3. 研究の方法

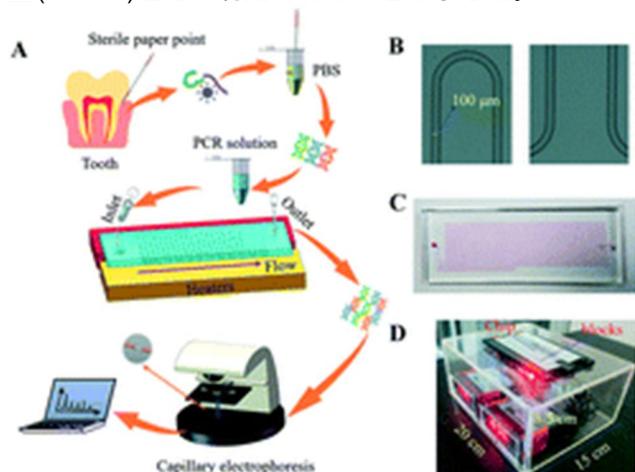
令和3年 Red complex (*Porphyromonas gingivalis* (P.g), *Treponema denticola* (T.d), *Tannerella forsythia* (T.f)) は、歯周炎と強く関与することが報告されている。これら RedComplex の評価方法としてマイクロ流体チップを用いた。連続フローPCR (CF-PCR) に基づくマイクロ流体チップは、温度変換に必要な時間を効果的に短縮できるため、従来のサーマルサイクラーに代わる理想的な手段である。CF-PCR マイクロ流体チップを用い P.g、T.d、T.f のマルチ PCR を検討した。

令和4年 連続フローポリメラーゼ連鎖反応 (CF-PCR) マイクロ流体チップの使用は、標的遺伝子の増幅に要する時間を短縮する理想的な方法であるが、一方でスループットの低いアンプリコンが問題となることがある。例えばマルチプレックス PCR は、チップ内で複数の標的遺伝子を同時に増幅することができるが、交差反応のために偽陽性を誘発しやすい場合がある。この問題を回避するために、CF-PCR アレイマイクロ流体チップをベースとしたマイクロ流体システムを作製した。

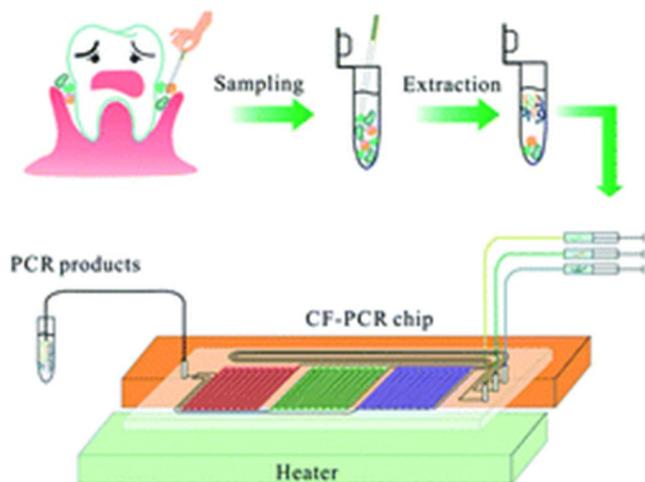
令和5年 連続フローポリメラーゼ連鎖反応 (CF-PCR) マイクロ流体チップは歯周病のグレード決定におけるポイントオブケア(POCT)に応用することができる。その特徴として、異なる温度のヒーター上にマイクロ流体チップを配置することで、ターゲット遺伝子の迅速な増幅を実現できることをあげることができる。しかし、加熱による気泡や蒸発が常に発生し、増幅が安定しない欠点がある。また、一定の高さを持つ CF-PCR マイクロ流体チップでの水中油滴は、長く蛇行するマイクロチャンネルによる高い抵抗のため解析に時間がかかる。これらの欠点を克服するため、流体抵抗を減少させる二重層の水滴 CF-PCR マイクロ流体チップを提案し、ナノリットルの水滴を生成して気泡や蒸発を最小限に抑えた。

4. 研究成果

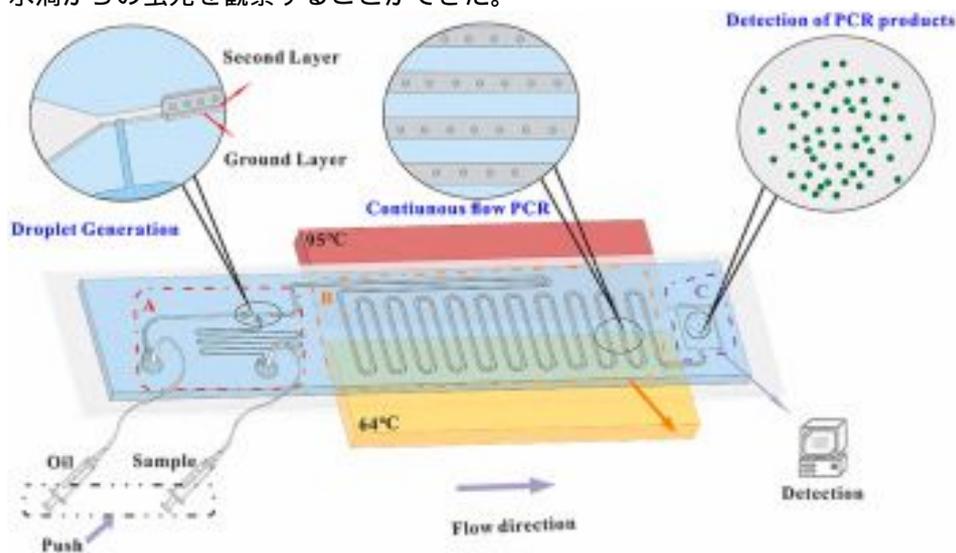
令和3年 一連の実験を通して、これら3菌の multi-PCR を行うのに適したプライマーの最適な組み合わせが2つ得られた。それぞれのアンプリコンサイズは (197 bp, 316 bp, 226 bp) および (197 bp, 316 bp, 641 bp) であった。また、マルチ PCR を用いることで、短いサイズのアンプリコンでは増幅時間を最短 3'48" に短縮できること、T.f (641 bp) では最短 8'25" に短縮できることが示された。令和3年に発表した CF-PCR は、P.g、T.d、T.f の標的遺伝子を同時に短時間で増幅する有効な方法を提供し、歯周炎のグレード分類決定におけるポイントオブケア検査(POCT)として有効であることも示した。



令和4年 チップを3分割し、P.g、T.d、T.fの標的遺伝子を増幅することに成功した。その結果、P.g、T.d、T.fに必要な最小増幅時間はそれぞれ2'07"、2'51"、5'32"であった。また、P.g、T.d、T.fの標的遺伝子は8'05"未満で同時に増幅することができた。本研究で用いたCF-PCRは、歯周炎のグレード分類決定におけるポイントオブケア検査(POCT)として有効であることが示された。



令和5年 流体抵抗は、T字型接合部の高さが一定の場合、蛇行するマイクロチャネルの高さの増加に伴い減少する。流速、水滴のサイズ、および生成される水滴の数は、T字型接合部の断面積および水圧と正の相関がある。他の実験条件が同じ場合、水圧が高いと水滴の融合が発生する。T字型接合部の断面積が1600平方 μm ($40 \times 40 \mu\text{m}$)および水圧が7 kPaである場合、0.032 nLの水滴が生成される。P.gのターゲット遺伝子を11分16秒以内に増幅し、水滴からの蛍光を観察することができた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 Bo Yang, Ping Wang, Zhenqing Li, Chunxian Tao, Qingxiang You, Shinichi Sekine, Songlin Zhuang, Dawei Zhang, Yoshinori Yamaguchi	4. 巻 22(4)
2. 論文標題 A continuous flow PCR array microfluidic chip applied for simultaneous amplification of target genes of periodontal pathogens	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Lab Chip	6. 最初と最後の頁 733-737
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d1lc00814e.	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 -
1. 著者名 Aya Kasakawa, Shinichi Sekine, Kenji Tanaka, Jumpei Murakami, Sota Kondo, Hisanao Hazama, Kunio Awazu, Shigehisa Akiyama	4. 巻 41(4)
2. 論文標題 Effect of Q-switched Er:YAG laser irradiation on bonding performance to dentin surface	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dent Mater J	6. 最初と最後の頁 616-623
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2021-281. Epub 2022 Apr 29.	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 -
1. 著者名 Li Z, Liu J, Wang P, Tao C, Zheng L, Sekine S, Zhuang S, Zhang D, Yamaguchi Y.	4. 巻 21(16)
2. 論文標題 Multiplex amplification of target genes of periodontal pathogens in continuous flow PCR microfluidic chip	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lab Chip	6. 最初と最後の頁 3159-3164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d1lc00457c	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 -
1. 著者名 Izui S, Sekine S, Murai H, Takeuchi H, Amano A.	4. 巻 124
2. 論文標題 Inhibitory effects of curcumin against cytotoxicity of Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arch Oral Biol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2021.105058	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 -

1. 著者名 Li Zhenqing, Wang Yifei, Gao Zehang, Sekine Shinichi, You Qingxiang, Zhuang Songlin, Zhang Dawei, Feng Shilun, Yamaguchi Yoshinori	4. 巻 1251
2. 論文標題 Lower fluidic resistance of double-layer droplet continuous flow PCR microfluidic chip for rapid detection of bacteria	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 340995 ~ 340995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aca.2023.340995	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 -

〔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	久保庭 雅恵 (Kuboniwa Masae) (00303983)	大阪大学・大学院歯学研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	山口 佳則 (Yamaguchi Yoshinori) (20386634)	大阪大学・大学院工学研究科・特任教授 (14401)	
研究分担者	竹内 洋輝 (Takeushi Yoshiki) (40572186)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	
研究分担者	笠川 あや (Kasagawa Aya) (40876679)	大阪大学・歯学部附属病院・医員 (14401)	

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
---------	---------