

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670903

研究課題名(和文) 感染性口腔疾患における臨床応用を目指した新たな口腔微生物即時検出システムの確立

研究課題名(英文) Development of fast detection system for oral microorganism which aims clinical application in infectious oral diseases

研究代表者

永田 英樹 (Nagata, Hideki)

大阪大学・歯学研究科・招へい教員

研究者番号：50260641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： 口腔感染症に関連する微生物の種類や量を正確に簡便に測定することは、その診断や治療効果、予後の判定に重要である。本研究では、キャピラリー電気泳動を利用した検出器を有する微生物検出システムを構築し、その検出感度や定量性を検討した。その結果、開発した検出システムはリアルタイムPCR法とほぼ同等の感度や定量性が得られた。臨床サンプルを用いて有効性を検討した結果、高感度で簡便に歯周病細菌の検出や定量ができ、*Porphyromonas gingivalis*に関しては、線毛型も識別することができた。

研究成果の概要(英文)： It is important to examine kinds and quantity of microorganism associated with oral infectious diseases for diagnosis, efficacy of treatment, and prognosis. In this study, we developed the detection system with capillary polymer electrophoresis, and its sensitivity and quantity to detect oral microorganism were analyzed. Sensitivity and quantity of the detection system was equal to those of real-time PCR. The ease and the high sensitivity of the system to detect periodontopathic bacteria were illustrated by analyzing clinical saliva and plaque samples. Moreover, the system discriminated the type of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae.

研究分野： 予防歯科学

キーワード： 予防歯科学 口腔微生物 検出システム 歯周病細菌 PCR

1. 研究開始当初の背景

ヒトの口腔内には700種を超える口腔微生物が存在しており、デンタルバイオフィルムを形成し、多くの口腔疾患の原因となっている。う蝕や歯周病をはじめとする感染性の口腔疾患には特定の口腔微生物が関与している。したがって、口腔感染症の診断や治療効果の判定、予後の判定には口腔微生物の検査が有効である。

これまでに、口腔微生物の検出法としてはいくつかの方法が用いられてきた。1990年代前半までは主として「培養法」が用いられた。しかし、「培養法」は検出感度が低いことや検出に1週間程度の時間を要するという難点があった。1990年代半ばから「PCR法」が用いられるようになり、高い検出感度や検出時間の短縮が達成された。しかし、定量性に劣ることが難点であった。「リアルタイムPCR法」が臨床現場で行われると高感度定量も可能となった。しかしながら、チェアサイドで即時診断に応用できる操作時間ではなかった。「酵素活性測定法」は所用時間も短くチェアサイドでの検査が可能なため臨床応用されているが、検出感度が低く、測定できる菌種が少ないことなどの問題がある。

ごく最近開発されたインフルエンザウイルス検出システムは約10分でインフルエンザウイルスを検出できるシステムで、従来のインフルエンザ検出キットと検出感度において遜色がないことが報告されている。この検出システムはインフルエンザウイルス検出用に開発されたが、PCR法で増幅できるあらゆる微生物の遺伝子に応用することができるため、口腔微生物に対しても応用可能であると考えられる。う蝕や歯周病、口腔カンジダ症などは口腔微生物が原因で生じる感染症であり、その原因微生物が特定されている。したがって、これらの口腔感染症の診断や治療効果の判定、予後の判定には原因微生物のモニタリングが非常に有効であるが、チェアサイドで簡便かつ迅速にモニタリングできる有効な測定法がないのが現状である。

本研究は、インフルエンザウイルス検出に開発されたチップを口腔感染症の原因となる微生物の検出に応用し、従来の口腔微生物検出法とは異なるチェアサイドで応用できる新たな口腔微生物即時検出法を開発したいと考え、着想に至った。

2. 研究の目的

う蝕や歯周病など口腔微生物が原因となる口腔感染症の診断や治療効果の判定、予後の判定には口腔微生物の検査が有効である。これまでに、「培養法」、「PCR法」、「リアルタイムPCR法」および「酵素活性測定法」など様々な口腔微生物検出法が開発され、臨床にも応用されてきたが、いずれも検出感度や定量性、検出時間等に問題があり、高感度かつ定量的で、チェアサイドで短時間に検

出できる口腔微生物検出法の開発が望まれてきた。ごく最近、インフルエンザウイルスを高感度で短時間に検出できるシステムが開発された。本研究では、このシステムを様々な口腔微生物に応用できるように改良することにより、チェアサイドで臨床応用可能な新たな口腔微生物即時検出システムを確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) キャピラリー電気泳動検出装置

インフルエンザウイルス検出システムを改良し、チップ部、サンプル注入部、遺伝子増幅部および検出部からなる微生物検出システムを構築した。小型チップにはサンプルの流路を作り、PCRまでをマイクロチップ内で行うように設計した。検出にはキャピラリー電気泳動を利用した。キャピラリー電気泳動は、従来の平板ゲル電気泳動と比較して、サンプル量が1/1000、分析時間が数分で、さらにPCRによる非特異的バンドを避けた定量解析が可能である。

(2) 検量線の作成

構築したシステムを用いて、PCRプロトコール、反応温度や反応時間などの諸条件を検討した。検量線の作成には、細菌の連続希釈懸濁液を用いた。

(3) 歯周病細菌の検出

重度の慢性歯周炎と強く関連する口腔細菌としてred complexが提唱されている。そこで、供試する細菌としてred complexを構成する3つの菌種から各1株(*Porphyromonas gingivalis* ATCC33277株、*Treponema denticola* ATCC35405株、*Tannerella forsythia* ATCC43037株)を選択し、それぞれからDNAを精製した。各サンプル、プライマー、DNAポリメラーゼを加え、PCR反応液とした。PCRは変性のため95、10秒、アニーリングと伸長のため64、30秒のサイクルを40回繰り返した。各細菌の標的となるDNA画分は、*P. gingivalis*は197bp、*T. denticola*は311bp、*T. forsythia*は641bpであった。PCR産物を混合し、2~15%の濃度に希釈して使用した。100bp DNA ladderをコントロールとして用いた。

また、*P. gingivalis*はその繊毛型により6型に分類されており、歯周病患者では、型線毛を有する*P. gingivalis*が高頻度で検出されることが報告されている。そこで、異なる線毛型を有する*P. gingivalis*(33277株: 型線毛、OMZ314株: 型線毛、6/26株: 型線毛、W50株: 型線毛、HNA99株: 型線毛)を用いて、本検出システムが同一菌種の線毛型を識別できるかどうかについても検討した。

(4) 臨床サンプルを用いたキャピラリー電気泳動システムによる歯周病細菌の検出

ボランティアから唾液やプラークを採取し、標的となる細菌の DNA 画分を PCR で増幅した。PCR 産物を 10% に希釈し、キャピラリー電気泳動システムで解析した。100 bp DNA ladder と 400 bp 標準サンプルを、それぞれ同定と定量に用いた。

4. 研究成果

(1) キャピラリー電気泳動による PCR 産物の解析

標的 DNA 画分のピークエリアを電気泳動像から計算し、標的 DNA 画分濃度に対してプロットしたところ、15%濃度のピークエリアは10%濃度のものよりも半分以上小さかったことから、粗 PCR サンプルは DNA の蛍光強度に影響を与えることが推察された。一方、時間を修正したピークエリアと標的 DNA 画分濃度との間には直線的な関連が認められ、各菌の連続希釈懸濁液から検量線を作成することができた。相関係数は、*P. gingivalis* では 0.9855、*T. denticola* では 0.9896、*T. forsythia* では 0.9969 と、いずれの菌種においても非常に高い相関が示された。また、検出限界は、*P. gingivalis* では 0.077 ng/μl、*T. denticola* では 0.114 ng/μl、*T. forsythia* では 0.098 ng/μl と、いずれの菌種においても非常に少ない菌数で検出できることが示された。

本システムでは、100~700 bp の DNA 画分がきれいに分離され、標的サンプルの検出に有効であった。7.5%に希釈された red complex の混合サンプルの PCR 産物は、95 秒以内に同時に明確に同定することができた。さらに、本検出システムは、*P. gingivalis* の線毛型も識別することができた。

(2) 臨床サンプルを用いたキャピラリー電気泳動システムによる red complex を構成する歯周病細菌の検出

P. gingivalis の PCR 産物 (197 bp)、*T. denticola* の PCR 産物 (311 bp)、*T. forsythia* の PCR 産物 (641 bp) は 95 秒以内に同時に検出することができ、その検出濃度は、*P. gingivalis* が 1.36 ng/μl、*T. denticola* が 0.44 ng/μl、*T. forsythia* が 1.62 ng/μl であった。本システムを用いて臨床サンプルを測定し、検量線を基に菌数を算定した結果、リアルタイム PCR を用いて測定した結果とほぼ一致した。

以上の結果から、本研究で開発した微生物検出システムは、迅速かつ正確に歯周病細菌を検出できる解析法であることが示された。将来的な臨床応用により、リスク診断のスピード化や効率化が期待でき、口腔感染症の診断や治療効果の判定、予後判定の有効なツールとなることが期待できる。

<引用文献>

Yamanaka K, Saito M, Kondoh K et al, Rapid detection for primary screening of

influenza A virus: microfluidic RT-PCR chip and electrochemical DNA sensor, *Analyst*, 2011, 136, 2064-2068

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA et al, Microbial complexes in subgingival plaque, *J Clin Periodontol*, 1998, 25, 134-144

Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I et al, Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis fimA* and periodontal health status, *J Dent Res*, 2000, 79, 1664-1668

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4件)

Chen J, Ni Y, Liu C, Yamaguchi Y, Chen Q, Sekine S et al (8名), Rapid identification and quantitation for oral bacteria based on short-end capillary electrophoresis, *Talanta*, 2016, 160, 425-430, 10.1016/j.talanta.2016.07.049, 査読有

Liu C, Yamaguchi Y, Sekine S et al (7名), Gene analysis of multiple oral bacteria by the polymerase chain reaction coupled with capillary electrophoresis, *J Sep Sci*, 2016, 39, 986-992, 10.1002/jssc.201501087, 査読有

Izui S, Sekine S, Maeda K, Kuboniwa M, Takada A, Amano A, Nagata H, Antibacterial activity of curcumin against periodontopathic bacteria, *J Periodontol*, 2016, 87, 83-90, 10.1902/jop2015.150260, 査読有

Maeda K, Nagata H, Ojima M et al (4名), Proteomic and transcriptional analysis of interaction between *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus oralis*, *J Proteome Res*, 2015, 14, 82-94, 10.1021/pr.500848e, 査読有

[学会発表](計13件)

泉井秀介、関根伸一、天野敦雄、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* による細胞傷害に対するクルクミンの阻害効果、第31回日本香辛料研究会・学術講演会、2016年10月8日、長浜勤労者福祉会館(滋賀県長浜市)

泉井秀介、関根伸一、天野敦雄、*Porphyromonas gingivalis* による腸内細菌叢変化へのクルクミンの効果、第27回近畿・中国・四国口腔衛生学会・総会、2016年10

月 2 日、大阪大学（大阪府吹田市）

泉井秀介、関根伸一、永田英樹ら（4 名）*Porphyromonas gingivalis* ベシクルによる細胞傷害に対するウコン・クルクミンの阻害効果、第 65 回日本口腔衛生学会・総会、2016 年 5 月 28 日、東京医科歯科大学（東京都文京区）

関根伸一、泉井秀介、永田英樹ら（4 名）ラマン分光散乱を用いた新規口臭測定装置の開発、第 65 回日本口腔衛生学会。総会、2016 年 5 月 28 日、東京医科歯科大学（東京都文京区）

泉井秀介、関根伸一、永田英樹、クルクミンの歯周病予防素材としての可能性について、第 5 回口腔保健用機能性食品研究会・総会、2016 年 1 月 24 日、東北大学（宮城県仙台市）

泉井秀介、永田英樹、天野敦雄、クルクミンが *Porphyromonas gingivalis* ベシクルのヒト歯肉上皮細胞への侵入に及ぼす影響、第 57 回歯科基礎医学会学術大会、2015 年 9 月 13 日、朱鷺メッセ（新潟県新潟市）

前田和彦、永田英樹、小島美樹ら（4 名）*Porphyromonas gingivalis* のリンゴ酸脱水素酵素がバイオフィルム形成に及ぼす影響、第 64 回日本口腔衛生学会・総会、2015 年 5 月 29 日、つくば国際会議場（茨城県つくば市）

関根伸一、泉井秀介、橋野恵衣、永田英樹ら（5 名）マイクロチップ PCR とキャピラリー電気泳動システムを用いた即時細菌検査システムの開発、第 64 回日本口腔衛生学会・総会、2015 年 5 月 29 日、つくば国際会議場（茨城県つくば市）

Izui S, Sekine S, Nagata H et al (4 名), Inhibitory effect of curcumin on inflammatory responses of gingival epithelial cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* vesicles, 62nd Annual Meeting of JADR, 2014 年 12 月 5 日, KKR Hotel (大阪府大阪市)

Izui S, Sekine S, Nagata H et al (4 名), Inhibitory effect of curcumin on *Porphyromonas gingivalis* infection, 11th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry, 2014 年 9 月 18 日, Beijing, China

清原宏之、小島美樹、小野高裕、泉井秀介、関根伸一、永田英樹ら（7 名）歯周ポケット内細菌叢の複雑化が脂質プロフィールに与える影響・吹田研究、第 63 回日本口腔衛生学会・総会、2014 年 5 月 31 日、熊本市市民会

館（熊本県熊本市）

泉井秀介、関根伸一、高田明比古、前田和彦、久保庭雅恵、永田英樹ら（7 名）クルクミンが歯周病菌の生育およびバイオフィルム形成に及ぼす影響、第 63 回日本口腔衛生学会・総会、2014 年 5 月 31 日、熊本市市民会館（熊本県熊本市）

前田和彦、永田英樹、小島美樹、関根伸一ら（6 名）*Porphyromonas gingivalis* が *Streptococcus oralis* のタンパク質発現に及ぼす影響、第 63 回日本口腔衛生学会・総会、2014 年 5 月 30 日、熊本市市民会館（熊本県熊本市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 英樹 (NAGATA, Hideki)
大阪大学・歯学研究科(研究院)・招へい
教員
研究者番号：50260641

(2) 研究分担者

関根 伸一 (SEKINE, Shinichi)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号：70506344

橋野 恵衣 (HASHINO, Ei)
大阪大学・歯学部附属病院・特任助教
研究者番号：90614553

前田 和彦 (MAEDA, Kazuhiko)
大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教
研究者番号：00346165