

全身疾患に関わる口腔内ミュータンス菌の検出

Detection of oral mutans associated with systemic disease

広島国際大学医療栄養学部医療栄養学科 富田翔太

広島国際大学医療栄養学部医療栄養学科 高原優花

広島国際大学医療栄養学部医療栄養学科 鈴木月花

広島国際大学医療栄養学部医療栄養学科 中垣好花

広島国際大学健康科学部医療栄養学科 木村留美

広島国際大学健康科学部医療栄養学科 長嶺憲太郎

TOMIDA Syota, TAKAHARA Yuka, SUZUKI Tsukika,
NAKAGAKI Konoka, KIMURA Rumi, NAGAMINE Kentaro

『HIU 健康科学ジャーナル』第2号 抜刷

2023年3月1日 発行

全身疾患に関わる口腔内ミュータンス菌の検出 Detection of oral mutans associated with systemic disease

広島国際大学医療栄養学部医療栄養学科 富田翔太
広島国際大学医療栄養学部医療栄養学科 高原優花
広島国際大学医療栄養学部医療栄養学科 鈴木月花
広島国際大学医療栄養学部医療栄養学科 中垣好花
広島国際大学健康科学部医療栄養学科 木村留美
広島国際大学健康科学部医療栄養学科 長嶺憲太郎

TOMIDA Syota, TAKAHARA Yuka, SUZUKI Tsukika,
NAKAGAKI Konoka, KIMURA Rumi, NAGAMINE Kentaro

抄録

近年、口腔内細菌と様々な全身疾患との関連が注目されている。これまでの研究において *cnm* および *pa* 遺伝子を持つミュータンス菌 (*cnm+/pa+*ミュータンス菌) が非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の発症に影響を及ぼすことが示唆されており、早期発見が課題となっている。本研究では遺伝子増幅法の1つである Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いて、*cnm+/pa+*ミュータンス菌を短時間かつ特異的に増幅するプライマーの作製および条件を検討した。LAMP 用プライマーを *cnm* は4種類 (*cnm1*、2、3、4)、*pa* は3種類 (*pa1*、2、3) 設計し、LAMP による増幅をした結果、短時間に増幅したプライマーは *cnm2* および *pa1* であった。また、ソブリヌス菌、ジンジバリス菌、カンジダ菌を用いて特異性を見た結果、これらのプライマーはミュータンス菌以外の口腔内細菌を増幅しなかった。さらに、健常者の唾液を用いた検討を行った結果、約4人に1人が NASH 増悪因子として *cnm+/pa+*ミュータンス菌を保菌している事が明らかとなった。

キーワード：LAMP、ミュータンス菌、う蝕、遺伝子診断

1. 緒言

近年、歯科医療において口腔常在菌が全身に及ぼす影響について注目されている。例えば、脳出血や非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) などの疾患は、歯科領域でよく知られている全身疾患であり、口腔内細菌が血中に侵入することから生じる菌血症である¹⁾。

菌が血中に侵入する要因とルートは大きく分けて2つある。1つ目にう蝕 (虫歯) である。虫歯により歯に穴が開くことで、その穴を通り血中に侵入する。2つ目に出血である。抜歯後や歯周病により出血した部位から、菌が血中に侵入する¹⁾。

虫歯の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* (ミュータンス菌) は、脳出血や NASH の原因細菌として知られている。このうち、コラーゲン結合タンパクを発現する *cnm* 遺伝子を持つミュータンス菌 (*cnm*+ミュータンス菌) は脳内出血を引き起こす²⁾。また、*cnm* および *pa* 遺伝子を持つミュータンス菌 (*cnm*+/*pa*+ミュータンス菌) が、NASH の増悪に関与することが報告されるようになってきた³⁾。

cnm+ミュータンス菌が脳内出血を引き起こす作用機序は次のように考えられている。すなわち、通常の脳出血では脳血管の損傷により、傷口から露出したコラーゲン周囲に血小板が凝集する事で止血を行う。しかし、*cnm*+ミュータンス菌が血管内に付着する事で、血小板凝集が阻害され出血が延長される^{2, 4)}。一方、NASH はアルコールに起因しない他の要因で発症する肝炎である。発症のメカニズムは以下の通りである。メタボリックシンドロームによるインスリン抵抗性の増大が引き金となり、単純性脂肪肝を発症する (first hit)。その後、活性酸素により肝臓が炎症を起し、脂肪肝炎に発展する (second hit)⁵⁾。*cnm*+/*pa*+ミュータンス菌が肝臓に癒着することでインターフェロン (IF- γ)、メタロチオネインなどによる活性酸素の作用を亢進させ NASH を増悪させる⁴⁾。すなわち、*cnm*+/*pa*+ミュータンス菌による NASH の進展は second hit である可能性が考えられている³⁾。

LAMP 法は、65°C 付近の一定温度でインキュベートすることで、増幅産物もしくは増幅の有無を検出することが可能である^{6, 7)}。また、すべての試薬を反応容器に入れるだけという一工程で短時間に増幅産物が検出できる、簡易・迅速な遺伝子増幅法である⁸⁾。遺伝子検出の短縮には、増幅増強剤 (増粘剤) が重要となってくる。これまでの研究において、LAMP 反応液に増粘剤であるポリエチレングリコール (PEG) を添加する事で、従来用いられていたベタインなどの増強剤よりも遺伝子検出時間が短縮したことが明らかとなっている⁹⁾。

cnm 遺伝子を検出する為の LAMP 用プライマーは既に設計済みであるが、検出までに時間がかかっている¹⁰⁾。また *pa* 遺伝子の検出については、*cnm* 遺伝子に比べて研究が進んでお

らず、LAMPによる遺伝子増幅も行われていない状態である。本研究では、PEGを用いた場合の *cnm* 遺伝子を短時間に増幅させるための条件、および *pa* 遺伝子を検出する為のプライマーの設計およびその増幅条件を確立したことを報告する。

2. 材料と方法

2-1. LAMP用プライマー

標的遺伝子に対して、3'末端側と5'末端側に各3つの領域をそれぞれ規定する⁶⁾。これら6つの領域を認識するFIP、BIP、F3、B3の4種類のプライマーに加え、ループプライマーとしてLF、LBを設計した^{11、12)}。

LAMP法に用いる為の *cnm* 遺伝子に対するプライマーを4種類 (*cnm*1、2、3、4)、*pa* 遺伝子に対するプライマーを3種類 (*pa*1、2、3) 設計した。プライマーの塩基配列を表1および表2にそれぞれ示す。

2-2. 健常者唾液サンプル

今回用いたサンプルは、2021年4月から2022年3月の期間に本学学生に対して研究内容を説明し、同意が得られた23名を対象とした。本研究は、広島国際大学臨床研究倫理審査委員会の承認(倫21-006)を得て行なった。

2-3. LAMP法による遺伝子増幅

本研究では、2.5 μ LのLAMP用プライマー(*cnm*1、2、3、4、及び*pa*1、2、3)、1 μ Lの蛍光目視検出試薬(栄研化学株式会社)、任意の量の40%PEG、5Mベタイン、DW、1 μ Lの 10^3 分子及び 10^5 分子鋳型DNA、反応容器としてLoopamp遺伝子増幅試薬D(栄研化学株式会社)を用いて総量25 μ Lになるように調整し実験を行った。また、プライマーの特異性を検討するためにミュータンス菌以外の口腔常在菌であるソブリヌス菌(SS)、ジンジバリス菌(PG)、カンジダ菌(CA)を用いた。反応容器にすべての試薬を入れ、PCR装置(TaKaRa Thermal Cycler Dice Touch)を用いて65 $^{\circ}$ Cでインキュベートし、ゲル撮影装置(NIPPON Genetics)による紫外線照射で、設定時間ごとに増幅の有無を確認した。

表 1：LAMP 用プライマー (cnm) の塩基配列

| Primer | Name | 5'-primer sequence-3' |
|--------|------|--|
| cnm1 | FIP | GGCGACACCATTACTGTAACTGTTTCGTATAACCTGTTCTCT |
| | BIP | TTGAGCATGCTCATCAAACCTCACGGTATCACCGACTCAGAT |
| | F3 | TACTTGCCCTGAACCTCC |
| | B3 | GCAGTAACATTTTCATCGCTG |
| | LF | GCAGAATTCAGGAACAGTC |
| | LB | AGCGAACGGTGGTCTTACCG |
| cnm2 | FIP | AACCATTAAGCTGGAGGTTTCAGGAACCTGCTTTGTCTTGCGT |
| | BIP | CGTATAACCTGTTCTCTGACTGTAATATTAAAGCAGGCGACAC |
| | F3 | CCAGTAATACTGTCATTGAAAGT |
| | B3 | CGCTTTGAGTTTGATGAGC |
| | LF | GCAAGTATGTTGGTGATTTG |
| | LB | CCTGAATTCTGCCAGTTAAC |
| cnm3 | FIP | GGAAATACTGGCAGCTTCCAAGTAGCAGATTTAACGACAGTAACC |
| | BIP | GTAGTAGTGTGTCAGTAAAATTCGGGCACAGTATTACTGGCTTGCA |
| | F3 | TAGAAAACGCCGGTAGTC |
| | B3 | GCAAGACAAAGCAGTTGTT |
| | LF | TACCAGCGGCGCAAGACAG |
| | LB | AATTCACCCCAGCCGGTGAT |
| cnm4 | FIP | AATCATGTGCGCTGGTTTTTGAATATCACTGTCTACATAAGCATT |
| | BIP | CATCTGTCTGCATATCCCCAGTCGCTGAGGTTACTGTCGTT |
| | F3 | CAGACTGAATGTCATCTTCAA |
| | B3 | GGCAGCTTCCAAGTTACC |
| | LF | AATATCAACAATGAG |
| | LB | GTAGAAAACGCCGGTAGTCC |

表2: LAMP用プライマー(pa)の塩基配列

| Primer | Name | 5'-primer sequence-3' |
|--------|------|--|
| pa1 | FIP | TCTGGCAAATTGGTCGCTGGGTGATGTAGATACTAAAGTAGTTGG |
| | BIP | TCAAGGGAGTGCGAGTAAGGTGAACCATTTGTCTCTCCA |
| | F3 | CCGATGAAACGACCACTA |
| | B3 | AGATCAGTTTTAGGTACTTCAAC |
| | LB | CTGAACAAAGTCAAAACCAAGC |
| pa2 | FIP | GGTTCTGTAAAGTTTCCGTCTTCATGCTTCTATTAAGCTGCACTG |
| | BIP | TGGTCTATGATCTTGAGCCAAATGAGAAGCCTTAAGGAACCTCC |
| | F3 | AGGCATACGAAGATGAACAA |
| | B3 | GCTAAAAGCATCATCCACAG |
| | LB | GAACCTATCTTTGACAACAG |
| pa3 | FIP | CGCTACAGAGACTGCTGCTACGTAAAATTAGTAAAACACTGTGTGG |
| | BIP | AAGGTTTTTGCCGATGAAACGAATTTCCAGTTTGTGTTCCAAC |
| | F3 | TCAAAAAAACTTACGGTTTTTCG |
| | B3 | CCTCTGGCAAATTGGTCG |
| | LB | CTAGTGATGTAGATACTAAA |

3. 結果

3-1. cnm プライマーの条件検討

cnm1~4のプライマー全てにおいてPEGの終濃度は0%、6%、8%、10%とし、増幅確認時間を45分から90分までを15分刻みに確認した。この結果、検出時間が早い順にcnm2プライマーがPEG濃度10%で45分、cnm3プライマーがPEG濃度10%で75分、cnm1プライマーとcnm4プライマーがPEG濃度10%で90分に確認された(図1)。

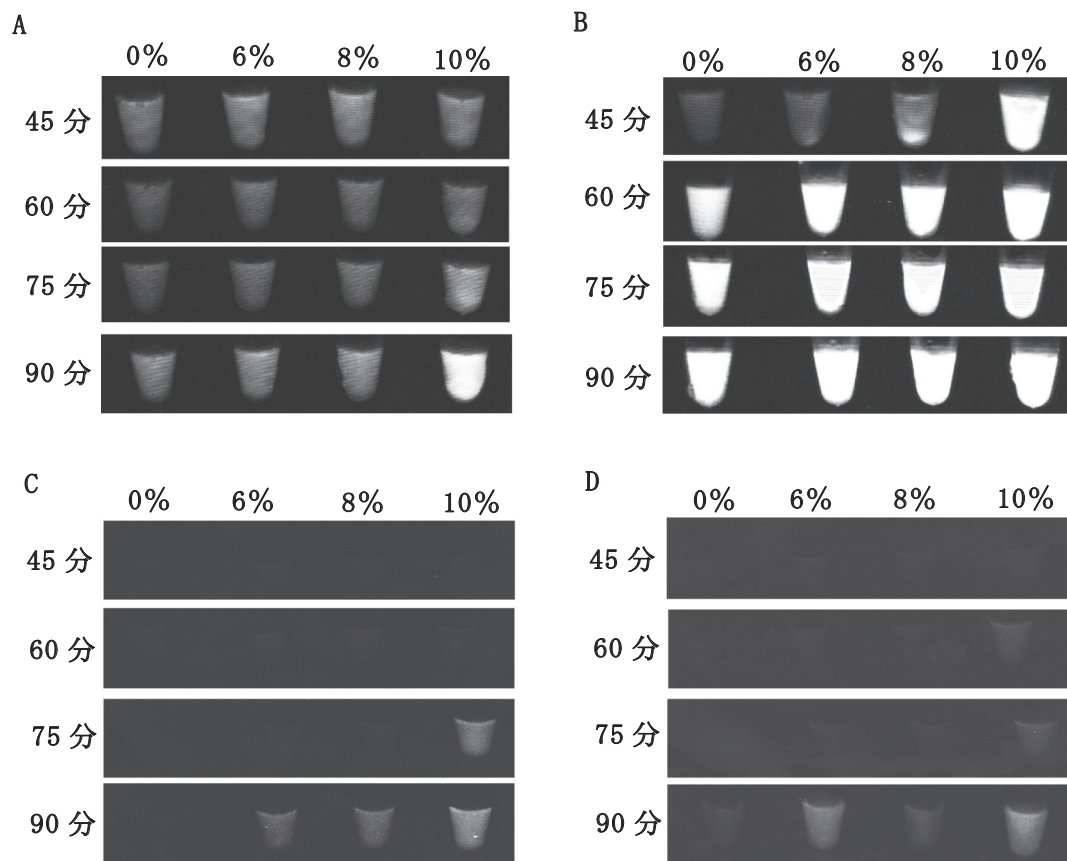


図 1 : cnm プライマーの条件検討

A:cnm1 プライマー、B:cnm2 プライマー、C:cnm3 プライマー、D:cnm4 プライマー。
%値は反応液中の PEG 濃度を示す。

3-2. pa プライマーの条件検討

pa1 プライマーの PEG 終濃度は 8% に設定し、30 分、35 分、40 分で確認した。pa2 プライマーの PEG 終濃度は 0%、8%、10% とし、30 分から 75 分までを 15 分刻みに確認した。また、pa3 プライマーの PEG 終濃度は 12% とし、40 分から 10 分刻みに確認した。この結果、検出時間が早い順に pa1 プライマーが PEG 濃度 8% で 35 分、pa2 プライマーが PEG 濃度 8% で 45 分、pa3 プライマーが PEG 濃度 12% で 60 分に確認された (図 2)。

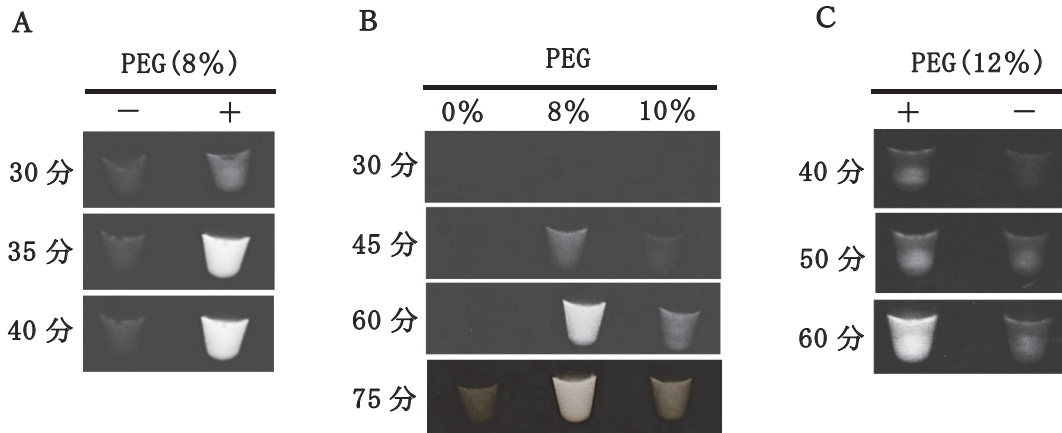


図2：paプライマーの条件検討

A: pa1 プライマー、B: pa2 プライマー、C: pa3 プライマー

-は陰性コントロール（蒸留水）、+は陽性コントロール（ 10^3 分子 DNA）を示す。

%値は反応液中の PEG 濃度を示す。

3-3. PEG とベタインの比較

先行研究^{12, 13)}より、*cnm* 遺伝子の検出は 10^3 分子以上で確認されている。しかし、この先行研究はベタインを用いた結果であり、PEG での報告は無い。そこで、今回用いた PEG とベタインを比較して、PEG の有用性がみられるか検討した。

この結果、いずれのプライマーにおいても、PEG を用いる事でベタインよりも短時間に検出することが可能であることが分かった(図3)。また DNA 数の比較では、 10^3 分子と 10^5 分子とではどちらも PEG 条件下で 45 分に増幅が確認された。

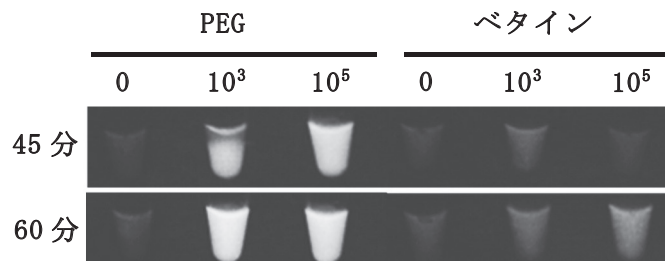


図3：PEG およびベタインの比較

cnm2 プライマーを用いた LAMP 反応である。0、 10^3 、 10^5 は DNA 分子数を表す。

3-4. プライマーの特異性の検討

今回作製したプライマーが、ミュータンス菌以外の口腔常在菌（ソブリヌス菌、ジンジバリス菌、カンジダ菌）に反応せず、*cnm* 遺伝子と *pa* 遺伝子のみの特異的に反応するかを検討した。なお、標的DNAは、(-)としてDW、(+)として 10^3 分子DNAを用いた。増幅確認時間は図1の結果を元に最初に増幅が確認された時間とし、*cnm2*プライマーは45分、*pa1*プライマーは35分とした。その結果、両プライマーともにミュータンス菌以外の口腔常在菌の遺伝子は増幅しなかった(図4)。

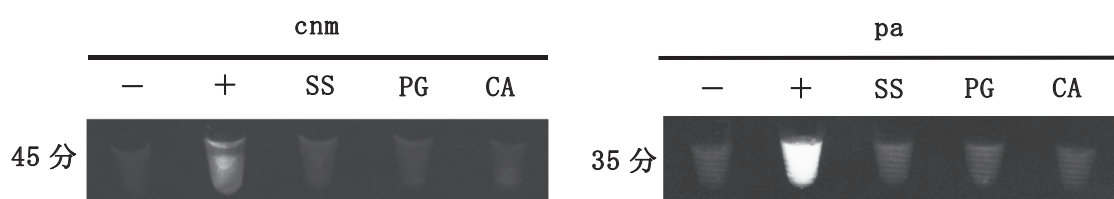


図4：プライマーの特異性の検討

SS はソブリヌス菌、PG はジンジバリス菌、CA はカンジダ菌を示す。-は陰性コントロール（蒸留水）、+は陽性コントロール（ 10^3 分子DNA）を示す。

3-5. 健常者の唾液を用いた遺伝子検出

説明と同意が得られた本学学生の唾液サンプル 23 名分を用いて、*cnm+*/*pa+*ミュータンス菌の保菌率を検討した。この結果、*cnm+*ミュータンス菌の陽性者は 23 名中 7 名であり、陽性率 30.4%であった。また、*pa+*ミュータンス菌の陽性者は 23 名中 20 名であり、陽性率 86.6%であった。さらに、*cnm+*/*pa-*ミュータンス菌の陽性者は 1 名で陽性率 4.3%、*cnm-*/*pa+*ミュータンス菌の陽性者は 14 名で陽性率 60.9%、*cnm+*/*pa+*ミュータンス菌の陽性者は 6 名で陽性率 26.1%という結果になった。(図5)。

4. 結論

増幅条件の検討から、PEG 濃度 10%で 45 分に増幅した *cnm2*、PEG 濃度 8%で 35 分に増幅した *pa1* を用いる事で、短時間に遺伝子増幅することが可能である事が明らかとなった。ベタインと PEG の増幅速度の比較では、ミュータンス菌の増幅は従来用いられてきたベタインよりも、PEGを用いる事で増幅時間が短くなった。また、DNA分子量の違いによ

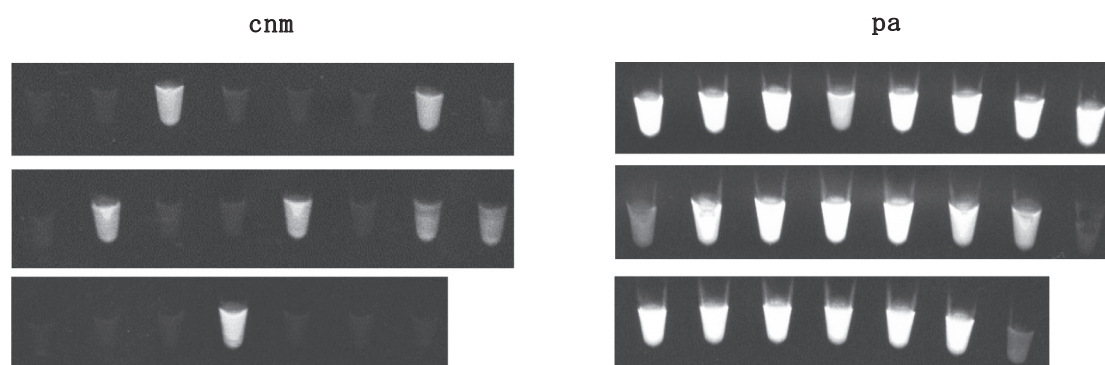


図5：健常者の唾液サンプルを用いた遺伝子検出

cnm は cnm2 プライマー、pa は pa1 プライマーで増幅した。

る感度の検討では、ベタインでの結果同様に 10^3 分子以上で増幅することから、ベタインと PEG の違いによるプライマーの感度に差はない¹¹⁾。分子量に対する影響が既存の結果と変わらず、短時間に遺伝子増幅が可能である事から、LAMP 法において PEG はベタインに比べて優れた増粘剤といえる。また、プライマーの特異性の検討から、cnm2 と pa1 はミュータンス菌以外の口腔常在菌（ソブリヌス菌、ジンジバリス菌、カンジダ菌）を増幅しなかったため、特異的なプライマーを作製できたと考える。

健常者の唾液サンプルを用いた結果から、PEG を添加した *cnm*+ミュータンス菌の陽性率は 30.4%であった。先行研究よりベタインを添加した場合の陽性率は、26.4%であることが分かっている^{13, 14)}。既存の研究データと比較しても陽性率が大きく乖離しておらず、PEG を用いてもベタインと同様に *cnm*+ミュータンス菌の検出が可能であるといえる。また、*pa*+ミュータンス菌の陽性率は 86.6%であった事から、*pa* 遺伝子は *cnm* 遺伝子に比べ高い割合で人の口腔内に存在することが明らかとなった。さらに、*cnm*+/*pa*+ミュータンス菌の陽性率から、約 4 人に 1 人が NASH の増悪に関与するミュータンス菌を保持している可能性が推察できた。

今後、本研究で確立した検出法を用いて *cnm*+/*pa*+ミュータンス菌を早期発見し、積極的な口腔ケアに取り組むことで、NASH の発症予防につながることを期待する。

5. 謝辞

本研究は JSPS 科研費 JP20K02352（長嶺）、JP22K11894（木村）の助成を受けたものです。

引用文献

- 1) 相澤 聡一、相澤(小峯)志保子：歯科領域の細菌感染症. 日大医誌、77(2)、71-75(2018)
- 2) S. Hosoki、S. Saito、S. Tonomura et al.: Oral Carriage of Streptococcus mutans Harboring the *cnm* Gene Relates to an Increased Incidence of Cerebral Microbleeds. CLINICAL AND POPULATION SCIENCES. Stroke. 2020;51:3632-3639(2020)
- 3) 沖 周平:非アルコール性脂肪肝炎悪化に対して口腔細菌の及ぼす影響. 小児歯科学雑誌. 53(3):367-372(2015)
- 4) 仲野 和彦:Streptococcus mutans の及ぼす 全身への影響を探求し続けて. 阪大歯学雑誌. 62(1):1-9(2017)
- 5) 橋本 悦子:NASH(非アルコール性脂肪肝炎)の最前線. 日内会誌、101、2316-2321(2012)
- 6) T. Notomi、H. Okayama、H. Masubuchi et al.、 Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res.、 28(12) E63 (2000)
- 7) K. Nagamine、K. Watanabe、K. Ohtsuka、 et al、 Reaction of loop-mediated isothermal amplification using the non-denaturation template. Clin. Chem.47:1742-1743(2001)
- 8) 牛久保 宏:LAMP 法の原理—遺伝子の簡易・迅速な増幅法—. ウイルス、54(1):107-112(2004)
- 9) 野瀬 健太、長嶺 憲太郎、徳田 純一 他:等温遺伝子増幅技術 LAMP 法の polyethylene glycol 添加に関する検討. YAKUGAKU ZASSHI、133(10)、1121-1126(2013)
- 10) M. Kitagawa、K. Nagamine、H. Oka et al.: Rapid detection of the Streptococcus mutans *cnm* gene by loop-mediated isothermal amplification. Anal. Biochem.、605、11382(2020)
- 11) K. Nagamine、T. Hase、T. Notomi: Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol. Cell. Probes、16(3)、223-229(2002)
- 12) Y. Mori、K. Nagamine、N. Tomita、 et al.: Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. Biochem. and Biophys. Res. Communicat.、289(1)、150-154(2001)
- 13) 北川 雅恵、長嶺 憲太郎:全身疾患に関わる口腔内細菌の遺伝子検査. Precision Medicine、4(8)、796-800(2021)
- 14) 長嶺 憲太郎:LAMP 法を用いた口腔内細菌の簡便・迅速診断法の開発. 化学工業、72(12)(2021)