

歯周病原菌検出のためのPCR-ICA法の開発

バイオ応用室 岡 千寿, 田中 正男
(株)三菱化学ヤトロン 阪口 勝亮
日本大学 松戸歯学部 高田 和子, 平澤 正知

Development of PCR-ICA for Detection of Periodontopathic Bacteria

Chitoshi OKA, Masao TANAKA, Yoshiaki SAKAGUCHI¹,
Kazuko TAKADA² and Masatomo HIRASAWA²

¹Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc. ²Nihon University School of Dentistry at Matudo

歯周病予防の観点から簡便で迅速な病原菌量判定キットの開発が求められている。本研究は、主要歯周病原菌の1つである *Porphyromonas gingivalis* の16S rRNA遺伝子の特異プライマーを設計し、PCR法とイムノクロマト法(ICA法)と組み合わせることによりPCR産物の増幅の有無を肉眼で判定できる系を開発した。設計したプライマーは、他の歯肉溝常在菌とは反応せず、感度良く簡易検出が可能であること、さらに、実際の臨床検体でもPCR法とICA法の間に関連が認められPCR-ICA法の有用性を確認することが出来た。

1. はじめに

歯周病は、炎症が歯肉辺縁に局限した歯肉炎と歯の支持組織の広範な炎症と破壊を伴う歯周炎に大別される。この歯周炎の活動期には歯肉縁下プラーク中の嫌気性桿菌(歯周病原菌)が増加することが知られている。また、統計によると40歳代を過ぎると7割以上の人が少なくとも1本以上の歯が歯周炎になっているといわれており、高齢化社会の病気の一つでもある。歯周炎はほとんど自覚症状がないため、悪化して、はじめて歯科医の診察を受けることが多く、高齢者が歯を失う最大の原因でもある。また、心筋梗塞や狭心症を発症している患者の血管内血栓から歯周病原菌が検出されており、口の中だけの病気と考えられがちだが、気づかないうちに全身の健康に影響を及ぼす可能性のある怖い病気である。

本研究では、代表的な歯周病原菌の1つである *Porphyromonas gingivalis* の16S rRNA遺伝子配列を用いて簡易同定キット開発の基礎技術となるPCR-ICA(Immuno Chromatographic Assay)法について検討した結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 実験材料

モデル実験には、*Porphyromonas gingivalis*

ATCC 33277株を供試菌株として用いた。有用性の検討には、*Porphyromonas gingivalis* や歯肉溝常在菌である *Prevotella* 属菌を主に使用した。これらの細菌の培養は、ヘミン(5mg/1)、メナジオン(1mg/1)、カナマイシン(750mg/1)添加血液平板培地、及びGAM液体培地を用い、嫌気チャンバー内で行った。

2.2 16S rRNA遺伝子の増幅

嫌気パックを用いて歯周病原菌(*P. gingivalis*)を培養した平板寒天培地から菌体をかき取り、染色体DNAを調製した。これを用いて、以下のプライマーにより16S rRNA遺伝子をPwo DNA polymeraseにより増幅した。Sens primer: 27F(AGAGTTTGATCMTGGCTCAG, Antisens primer: 1492R(TACGTTACCTTGTTACGACTTT)。

2.3 増幅断片のクローニング

PCR産物を0.8%アガロース・ゲル電気泳動により確認し、約1.5kbpの増幅バンドを回収した。これを大腸菌のベクターpZEr0-1のEcoRV siteに挿入し、373A-18 DNA Sequencer (ABI社製)により塩基配列を確認した。

クローニングした1.5kbpの16S rRNA遺伝子断片をHindIII, KpnIで切断し、標的配列を含む580bpの遺伝子断片をpBluescript SK(+)にサブクローニングし、以後の実験に供した。

2.4 特異プライマーの設計

P. gingivalis (L16492), *Actinobacillus actinomycescomitans* (M75035), *Prevotella intermedia* (L16468), *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) (L16495), *Treponema denticola* (M71236), *Campylobacter rectus* (L06973), *Fusobacterium nucleatum* (M58683)等の16S rRNA遺伝子の配列を比較して*P. gingivalis*に特異的なプライマー配列を設計した。また、これらのプライマーは、5'-末端をそれぞれ FITC-、及び、Biotin-で修飾したラベルプライマーとして合成した。プライマーの配列は以下のとおり。FITC-ラベル(ATACCGTCAAGCTTCCAC), Biotin-ラベル(GGTTTTACCATCAGTCA)。

2.4 PCR反応とゲル電気泳動

PCR反応は、以下のような温度プログラムで行った。95℃ ; 3分(95℃;30秒, 50℃;30秒, 72℃;30秒 : 30サイクル)72℃ ; 3分。

モデル実験ではクローン化した *P. gingivalis* の16S rRNA遺伝子断片をテンプレートとして用いた。また、有用性の検証には、*P. gingivalis* から調製したゲノムDNA, または、歯肉溝常在菌の菌体を用いてPCR反応を行った。

PCR産物の確認は、12% ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動, または、4% アガロース・ゲル電気泳動により行った。

2.5 イムノクロマト法による検出

金コロイド標識したストレプトアビジン含むろ紙を末端に付着させ、抗FITC抗体を中央部に固定したスティックを調製した。

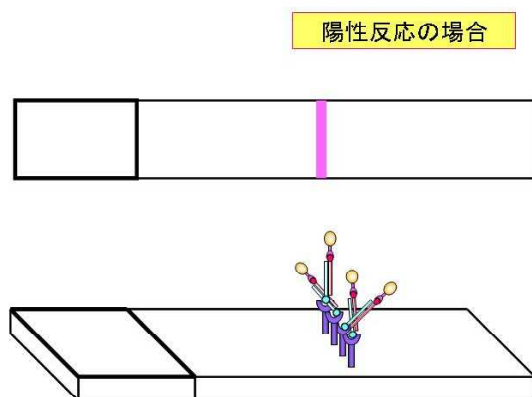


図1 ICA法によるPCR産物の検出原理

5'-末端をそれぞれ FITC-とBiotin-ラベルし

たプライマーでPCR反応を行い、生じたPCR産物を金コロイド標識したストレプトアビジン(Biotinと特異的に結合する)と抗FITC抗体によりイムノクロマト(ICA)法により検出できるかどうかを検討した。PCR産物(10 μl)を希釈液で10倍希釈した後、ろ紙上に滴下し、抗FITC抗体にトラップされた金コロイド粒子の赤色バンドの有無により判定を行った。(図1 参照)

3. 結果及び考察

3.1 PCR-ICA法のモデル実験

P. gingivalis の16S rRNA遺伝子全長を含んだプラスミドを用いて特異プライマーによるPCR反応を行ったところ、179bpの増幅バンドが検出された。(図2a)また、このPCR産物をイムノクロマト法により検出したところ、金コロイドバンドが肉眼で観察された。さらに、このバンド濃さとPCR産物の濃度には相関があり半定量的に簡易検出が可能であることが確認された。(図2b)

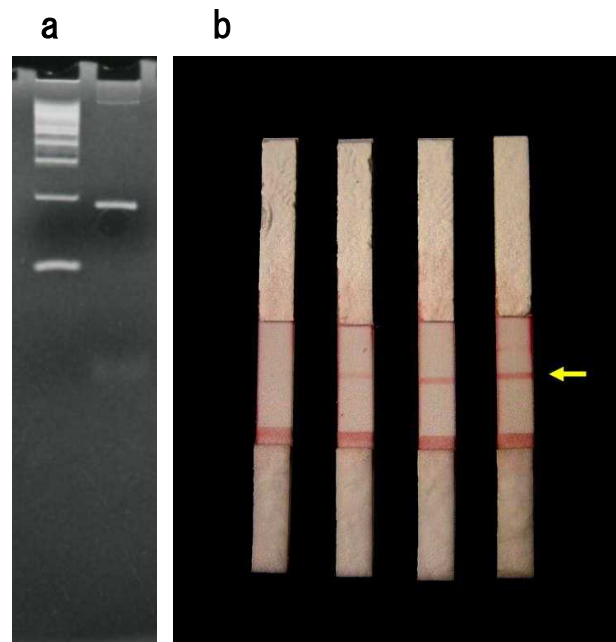


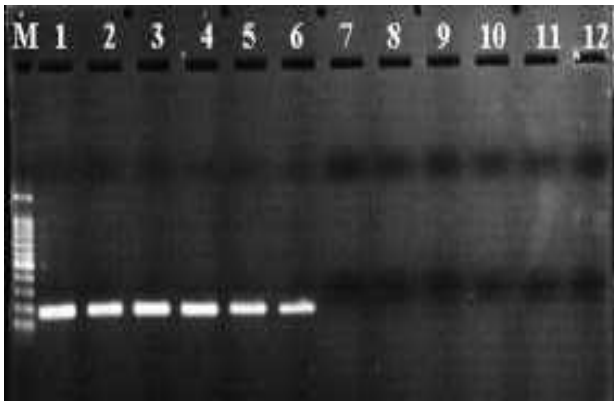
図2 特異プライマーによるPCR産物(a)とイムノクロマト法による検出(b)

3.2 PCR-ICA法の臨床検体での検証

モデル実験の結果、PCR-ICA法により歯周病の原因菌のひとつである *P. gingivalis* を簡易検出することが可能だと思われたため、実用性等の検討を日大松戸歯学部で実施した。

設計したプライマーの特異性を検討するため、*P. gingivalis* 及びその類縁菌についてPCR反応

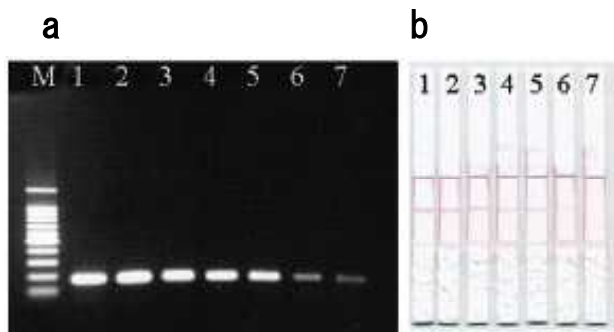
を行ったところ、黒色色素産生細菌である *Prevotella* 属からは増幅が見られず、*P. gingivalis* に特異的なプライマー配列であることを確認することが出来た。(図3 Lane 1~6)



Lane 1 *P. gingivalis* ATCC 33277
 Lane 2 *P. gingivalis* 381
 Lane 3 *P. gingivalis* W83
 Lane 4-6 *P. gingivalis* (Clinical isolates)
 Lane 7 *P. endodontalis* ATCC 35406
 Lane 8 *P. intermedia* ATCC 25611
 Lane 9 *P. nigrescens* ATCC 33563
 Lane 10 *P. melaninogenica* ATCC 25845
 Lane 11 *P. denticola* ATCC 33185
 Lane 12 *P. loesheii* ATCC 15930

図3 設計したプライマーの特異性の検討

また、検出感度は非常に良く、1~10 CFUで検出が可能であった。(図4)



Lane 1 1×10^6 cells
 Lane 2 1×10^5 cells
 Lane 3 1×10^4 cells
 Lane 4 1×10^3 cells
 Lane 5 1×10^2 cells
 Lane 6 1×10^1 cells
 Lane 7 1×10^0 cells
P. gingivalis ATCC 33277

図4 ICA法の検出感度の検討

さらに、臨床検体を用いて検討した結果、PCR法とICA法の結果はほぼ相関しており、十分に実用性があると判断された。(表1で示すとおり、32検体中30検体の結果が一致。)

表1 臨床検体を用いたPCR法とICA法の比較

PCR法	PCR-ICA法	
	陽性	陰性
陽性	27	2
陰性	0	3

表1の中でPCR法で陽性で、PCR-ICA法で陰性となっているものが2例あるが、これらについてはPCR法でも増幅バンドが薄く検出限界に近いためであったと思われる。

4. まとめ

PCR-ICA法は、FITC-とBiotin-で2重標識されたPCR産物をイムノクロマト法により簡易に検出するものである。現在、一般的に行われているゲル電気泳動による検出法では最低でも30~40分時間がかかるところをこの方法では、5分以内に検出することが出来る。

今回検討した *P. gingivalis* の特異的プライマーでは、PCR-ICA法により歯周病原性細菌の有無を肉眼で検出できるため、歯周病予防の観点から簡便で迅速な病原菌量判定キットになり得ると考えられた。

また、今後、ポータブルで高速なPCR反応装置等の開発や、PCR試薬等のキット化などが進めば、PCR-ICA法による検出は、幅広い分野での応用が期待できる。

参考文献

1) K. Takada *et. al.* *Journal of Periodontology* ; 76(4) : 12-16 (2005)