

[総 説]

遺伝子検査方法を用いた歯周病関連菌種の分布

柳沢英二

株式会社マイクロスカイラボ

(平成 30 年 8 月 2 日受付)

歯周病は、歯周ポケットへの歯周病病原菌の感染によって引き起こされる炎症性疾患であり、歯周組織に種々の細菌がバイオフィームを形成して定着する。心内膜炎や糖尿病あるいは動脈硬化症などの全身性疾患との関連も指摘されており重要な疾患となっている¹⁾。歯周病原菌は、まだ確定はされていないが、歯周病患者のプラークから高頻度で分離される細菌による複合感染と考えられており、そのなかで偏性嫌気性グラム陰性桿菌の *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) が歯周病原菌としてもっとも関連が強いといわれている²⁾³⁾。*P. gingivalis* は、線毛の主要構成タンパクの1つであるフィブリン (FimA) の遺伝子 *fimA* が、塩基配列の違いにより I から V 型に分類され II 型、IV 型が強力な歯周病のリスク因子になることが知られている^{4)~6)}。

Key words: 歯周病原菌, *Porphyromonas gingivalis*, 線毛遺伝子型

1. はじめに

口腔疾患のひとつである細菌感染を起因とする歯周病は、歯科領域では重要な疾患であり、心内膜炎や糖尿病等の原因菌を引き起こすことが知られている、当施設でも抜歯後培養陰性であった患者が心内膜炎で死亡し、剖検より採取した検体より Polymerase Chain Reaction (PCR) 法にて *P. gingivalis* が検出された経験を持っている。歯周病の原因菌の主な菌種として *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia* (*p. intermedia*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*), *Treponema denticola* (*T. denticola*) および、*Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) などが主にあげられる。現在歯科領域では、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いて定量的に測定され始めているのが現状である。本稿では、2017 年 11 月から 2018 年 4 月までに、インプラント科で治療を受

けた 120 検体について、歯周病原菌の分離率および *P. gingivalis* の線毛 (*fimA*) 遺伝子型の分布を概説する。

2. 歯周病原菌の分離

歯周病の発症因子には、歯周病原菌のほかに環境因子 (喫煙・食育・生活習慣・ストレス等) や生体因子 (免疫・遺伝等) の関与に加え、力の因子 (歯ぎしり・不正咬合等) が重要な因子の一つと考えられている。歯周病原菌は、タンパク質やアミノ酸を栄養源とし、PH はほぼ中性に保たれる。こうした糖非分解菌は、嫌気性環境下で生息するため、歯肉縁下プラークには、歯周病原菌である偏性嫌気性菌が増殖する⁸⁾。唾液は、口腔内の表層を覆っており、口腔内の微生物の宿主成分と考えられる。そのうち塩基性高プロリン糖タンパク (basic proline rich glycoprotein : PRG)、酸性高プロリン糖タンパク (acidic proline rich protein : PRP) およびスタセリン (statherin) の唾液タンパクが *P. gingivalis* の線毛と強く結合することが知られている^{4)~6)9)}。また、関節リウマチ患者の 8 割の血液中には、抗シトルリタンパク抗体が検出される。この抗体は関節リウマチの発症に先立って検出され、歯周病の一種である *P. gingivalis* は、現在知られている中で唯一シトルリン化を起こす酵素を産生する

著者連絡先：(〒125-0041) 東京都葛飾区東金町 6-6-5 三井生命金町ビル 2F
株式会社マイクロスカイラボ
柳沢英二
TEL: 03-3826-5040
FAX: 03-3826-5041
E-mail: h-yanagisawa@mskylab.co.jp

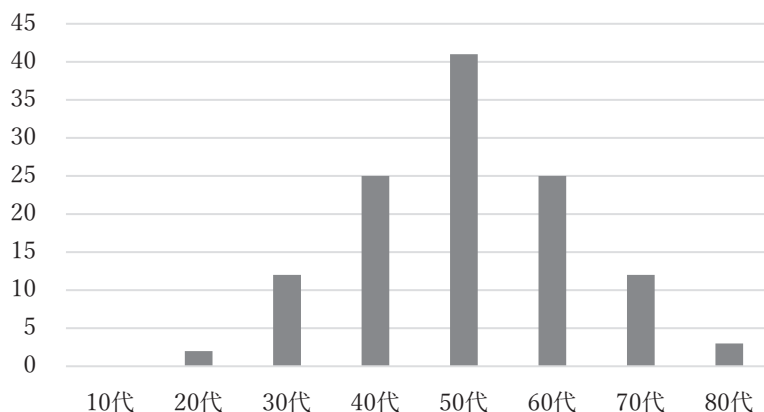


図 1. Number of patients according to age

Periodontal pathogens	Primer/Probe	Sequence (5'-3')
<i>Actinobacillus-actinomycetemcomitans</i>	Primer F	GAA CCT TAC CTA CTC TTG AC
	Primer R Probe	TGC AGC ACC TGT CTC AAA GC FAM-AGA ACT CAG AGA TGG GTT TGT GCC TTA GGG-TAMRA
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Primer F	GCG CTC AAC GTT CAG CC
	Primer R	CAC GAA TTC CGC CTG C
	-Probe	FAM-CAC TGA ACT CAA GCC CGG CAG TTT CAA-TAMRA
<i>Tannerella forsythia</i>	Primer F	GGG TGA GTA ACG CGT ATG TAA CCT
	Primer R	GCC CAT CCG CAA CCA ATA AA
	Probe	FAM-CCC GCA ACA GAG GGA TAA CCC GG-TAMRA
<i>Treponema denticola</i>	Primer F	CCG AAT GTG CTC ATT TAC ATA AAG GT
	Primer R	GAT ACC CAT CGT TGC CTT GGT
	Probe	FAM-ATG GGC CCG CGT CCC ATT AGC-TAMRA
<i>Prevotella intermedia</i>	Primer F	ATC CAA CCT TCC CTC CAC TC
	Primer R	TCC ACC GAT GAA TCT TTG GTC
	-Probe	FAM-CGT CAG ATG CCA TAT GTG GAC AAC ATC G-TAMRA
Universal	Primer F	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T
	Primer R	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT
	Probe	FAM-CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC AC-TAMRA

- ・ 20 μ l of each periodontal pathogen reaction mix + 5 μ l of sample + 5 μ l of cDNA (or negative control)
- ・ Thermal cycler conditions: 50°C (2 min) \times 1, 95°C (10 min) \times 1, 95°C (15 s) \times 60, and 60°C (1 min) \times 50

図 2. The TaqMan probe method

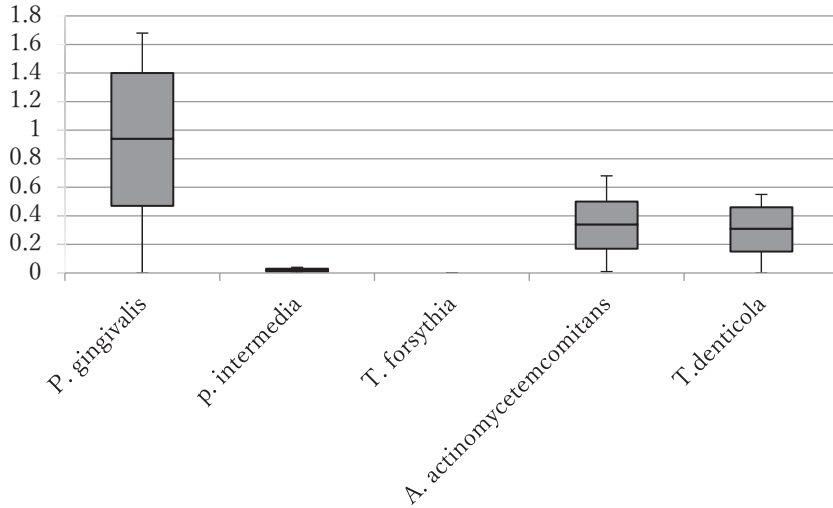
菌であり、関連性があるか研究されている。歯周病患者と抗シトルリントタンパク抗体との相関はあるという報告はあるが、*P. gingivalis* との相関があるかは証明されていないため医科との共同研究が望まれる。

当施設で、インプラント科で治療を受けた患者に対し歯周病検査を実施したデータでは、年齢分布は、50代が30%強を占め30代から70代が大多数を占めた(図1)。男性、女性の比率は女性68名、男性51名、未記入1名で女性の患者が多かった。唾液検体は、5°C前後で搬入し当日DNAを抽出し、各菌種に特異的なPCRプライマーを作成し、歯周病原因菌の検出を行った⁷⁾(図2)。歯周病原因菌の陽性率は、*P. gingivalis*

56.7%, *p. intermedia* 40.8%, *T. forsythia* 95.8%, *A. actinomycetemcomitans* 4.2%, *T. denticola* 80%であり、*A. actinomycetemcomitans* の陽性率は他の菌種に比較し低かった。各菌種の分離率は、各患者の唾液中の総菌数を各菌種の菌数で割り比率を算定し、比較したが大きいデータのばらつきはなかったが(図3)、インプラント科に通院している95%強の患者は歯周病原因菌を保有していた。

3. *P. gingivalis* の線毛 (*fimA*) 遺伝子型および分布

P. gingivalis の菌体表層に豊富に存在している線毛



	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>	<i>T. forsythia</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>T. denticola</i>
90th percentile	1.680	0.870	0.040	0.680	0.550
75th percentile	1.400	0.720	0.030	0.500	0.460
Median	0.940	0.480	0.020	0.340	0.310
25th percentile	0.470	0.240	0.010	0.170	0.150
10th percentile	0.190	0.100	0.004	0.070	0.060
Minimum value	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000

図3. Species isolation rate

(fimbriae) は、フィンブリリンまたは FimA をコードする遺伝子 *FimA* がクローニングされ、口腔内への付着・定着に重要な役割をはたしている。*FimA* タンパク質に多型が存在する可能性が指摘されており、Fujiwara らにより遺伝子の配列解読がなされ、初めて4種類に分類された。現在では *FimA* 遺伝子にはI型からV型およびI型の亜型としてIb型の6つの遺伝子型に分類されているが、*FimA* 遺伝子型により歯周病の病態が異なることが報告されている。疫学分析からII型およびIV型が重度の歯周病患者から多く分離され、I型およびV型は健康者から多く分離されることが報告されている^{4)~6)}。これは歯周病の重篤度と *P. gingivalis* のII型 *FimA* との強い関連性が確認されたことになる。

我々も *P. gingivalis* のI型からV型 *FimA* 遺伝子に特異的なPCRプライマーを用いて(図4)歯周病病原菌検査で陽性になった68名について、*P. gingivalis* の *FimA* 型別をPCR法により行った。その結果は、I型保有株1名、I型およびII型保有株18名、

II型保有株39名、II型およびIV型保有株1名、IV型保有株8名、V型保有株1名であった。重度の歯周病患者から分離されるといわれているII型およびIV型保有者が68名中66名と高かった(2タイプ検出された患者も含む)(図5)。すなわち歯周病患者の97%がII型あるいはIV型を保有していたことになり、その内85%がII型であったことから天野らが報告しているデータを裏付ける結果であった。

4. おわりに

歯周病病原菌はまだ確定されていないのが現状であるが、今回5種類の歯周病病原菌について、PCR法による検索を試みたが、インプラント科にかかっている患者のほとんどがいずれかの菌を保有していた。今後の研究で歯周病病原菌が明確になることを期待する。*P. gingivalis* 線毛遺伝子は、唾液タンパク質と結合し、口腔内に侵入・定着し重度の歯周病を起こすことがわかってきた。しかし *P. gingivalis* 線毛の違いが宿主組織への定着や抗原性の違いに大きく影響し、菌

Primer		Sequence (5'-3')	Size (bp)
Type I	fim A-F	CTG TGT GTT TAT GGC AAA CTT C	389
	fim A-R	AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A	
type II	fim A-F	ACA ACT ATA CTT ATG ACA ATG G	256
	fim A-R	AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A	
type III	fim A-F	ATT ACA CCT ACA CAG GTG AGG C	253
	fim A-R	AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A	
type IV	fim A-F	CTA TTC AGG TGC TAT TAC CCA A	249
	fim A-R	AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A	
type V	fim A-F	CCC AAC AGT CTC CTT GAC AGT G	462
	fim A-R	TAT TGG GGG TCG AAC GTT ACT GTC	

Thermal cyler conditions: 95°C (5 min) × 1, 95°C (30 s) × 1, 58°C (30 s) × 37, 72°C (45 s) × 1, 72°C (7 min) × 1, and 4°C

図4. *P. gingivalis* FimA-type Primer

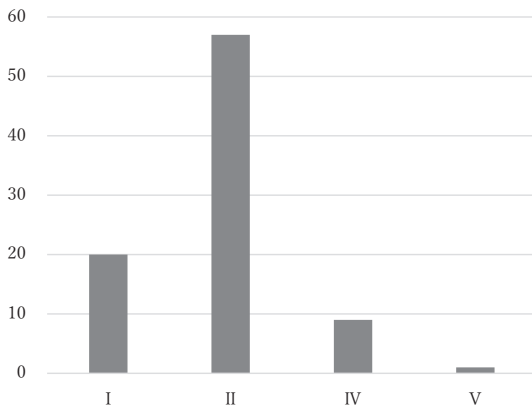


図5. Classification of *P. gingivalis* according to type

株間の病原性の差異は、線毛タイプにより、大きく影響されることを示唆している。我々のデータでも II 型遺伝子を保有する患者は、歯周病患者に圧倒的に多く認められることがわかった。

歯周病は、図1のごとく高齢化とともにますます増加する傾向が示唆される。歯周病原菌により、心内膜炎、脳梗塞、糖尿病、関節リウマチ、腎炎、妊娠性歯肉炎など歯周病が原因で誘発される病気が研究され始めている。高齢化が進んだ現在、今後歯科と医科とのより密な連携が必要となり共同の研究がなされることが望まれる。

利益相反：申告すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Mealey, B. L. 2000. Periodontol 21: 197-209 (1999).
- 2) Holt, SC, I Kesavalu, S Walker, CA Genco. 2000. Virulence factors of *Porphyromonas-gingivalis*. Periodontology 20: 168-238 1999.
- 3) Socransky, S. S., A. D. Haffajee. 2000. Periodontol 28: 12-55 (2002).
- 4) 中川一路. 2001. 新たな FimA 遺伝子を有する *Porphyromonas gingivalis* の分離とその分布. Jpn.J.Oral Biol. 43: 247-256.
- 5) 天野敦雄. 2003. *Porphyromonas gingivalis* 線毛の付着能と遺伝子多型の歯周病原生との関連. 日歯周誌 45 (4): 357-363.
- 6) 永野恵司. 2013. 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の FimA 線毛に関する研究. The Pharmaceutical Society of Japan 133 (9): 963-974.
- 7) Taichi, Ito, M Yasuda, H Kaneko, et al. 2014. Clinical evaluation of salivary Periodontal pathogen Levels by real-time polymerase chain reaction in Patients before dental implant treatment. Clin.Oral Impl.Res. 25: 977-982.
- 8) 有馬嗣雄. 2018. 未病の医療実現へ—病因論からみた「う蝕・歯周病」検査—。日本口腔検査学会誌 10 (1): 10-18.
- 9) Amano, A, H T Sojar, J Y Lee, et al. 1994. Salivary receptors for recombinant fimbriin of *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 62: 3372-3380.
- 10) Terao, C, K Asai, M Hashimoto, et al. 2015. Association of periodontal disease with anti-citrullinated peptide antibody in a Japanese healthy population the Nagahama study. Journal of Autoimmunity S0896-8411 (15) 00040-2.
- 11) Hashimoto, M, T Yamazaki, M Hamaguchi, et al. 2015. periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in pre-clinical stage of arthritis patients. PLOS ONE 10 (4):

e0122121.

Distribution of periodontal disease-related bacterial species using genetic testing method

Hideji Yanagisawa
Microskylab, Inc.

Periodontal diseases are caused by bacterial infection and are important oral diseases in the dental field. They are known to be caused by the causative bacteria in, for example, endocarditis and diabetes. The main bacterial species that cause periodontal diseases are *Porphyromonas gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *Treponema denticola*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, among others.

In this paper, we will outline the isolation rate of periodontal disease-causing bacteria and the distribution of the *fimA* genotype of *P. gingivalis* among approximately 120 specimens treated in our implant department between November 2017 and April 2018.