

[原 著]

タブレット型培地を用いた口腔内細菌の遺伝子検出

長嶺憲太郎<sup>1)</sup>・木村留美<sup>1)</sup>・北川雅恵<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 広島国際大学健康科学部医療栄養学科

<sup>2)</sup> 広島大学大学院医系科学研究科口腔顎顔面病理病態学研究室

(令和4年8月1日受付, 令和4年8月31日受理)

口腔内細菌の中には、う蝕や歯周病等の口腔疾患だけでなく全身疾患にかかわるものがある。これらの口腔内細菌の唾液からの検出・同定には、菌の培養と得られた菌からのDNA抽出およびPCRでの確認が必要となるため、操作が煩雑となり遺伝子検出は普及していない。本研究では、唾液の培養方法を改良し loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法と組み合わせることにより、唾液のサンプリングから検出までの操作を簡略化することを目的とした。タブレット型に成形したバシトラシン含有 Mitis-Salivarius 固形培地をマイクロチューブに入れたものを用意し、各チューブに唾液 200 µL を混合し、37°C の恒温槽中に静置した。培養1日後、唾液を直接 LAMP 反応液に添加し、*Streptococcus mutans* および *Streptococcus sobrinus* を認識するプライマーを用いて検出した。固形培地を入れたチューブを用いて唾液を培養した結果、*S. mutans* および *S. sobrinus* を増殖させることができた。また、このとき培養後の唾液から DNA 抽出操作なしで直接 LAMP 反応に用いても増幅できた。本法は簡便に短時間で多数のサンプルを処理するのに適しており、口腔内細菌の検出を汎用的に病院や歯科医院、集団検診などで行えることが期待できる。

**Key words:** tablet medium, loop-mediated isothermal amplification, oral bacteria, cavity, genetic diagnosis

序 文

う蝕原性細菌の一つである *Streptococcus mutans* のうち、コラーゲンと結合するタンパク質を発現する *cnm* 遺伝子陽性 *S. mutans* が脳の微小出血の進展に関わり、認知機能へ影響を与えることや感染性心内膜炎との関係が報告されている<sup>1)~3)</sup>。これまでう蝕予防を目的として *S. mutans* の菌数(量)を測定する検査は行われているが、*S. mutans* の *cnm* 遺伝子を調べる遺伝子検査は確立されていない。これまでの *cnm* 遺伝子を検出する方法は研究室レベルのもので、培養した菌から DNA 抽出し PCR を行うため、結果が出るのに 3~4 日程度必要となっていた。また、試薬やサーマルサイクラー、撮影装置など的高額な機器も必要なため、これらを持たない施設では取り組むことが困難である。

そこで、我々は *cnm* 遺伝子陽性 *S. mutans* を一般歯科臨床の場でも検査可能とすることを目的に、培養した唾液から菌を採取し、loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いて迅速に検出を行える方法を確立し、報告した<sup>4)</sup>。この研究で我々は、*S. mutans* をバシトラシン含有 Mitis-Salivarius (MSB) 培地で培養後、DNA 抽出を行わず、クルードのまま LAMP 法で *cnm* 遺伝子を検出することに成功した。この方法によって採取後 1~2 日で *cnm* 遺伝子の

判定が可能となり、DNA 抽出試薬を用いず、ヒートブロックのような恒温槽での検出もでき、費用面でも取り組みやすくなった。さらに、この方法によるボランティア 102 名の唾液を用いた検出では、*cnm* 遺伝子陽性 *S. mutans* の保菌率は 26.4% で、同サンプルの PCR での保菌率が 12.7% であったのに対して優れた感度を示した<sup>4)</sup>。

これまでの方法による検出では MSB 培地をプレートで作製し、増えた菌を phosphate-buffered saline (PBS) などで回収してサンプル液としていた。また、*S. mutans* が通性嫌気性菌であることを考慮して、嫌気用のパウチを用いて培養しており、培養にかかる費用が嵩んでいた。

今回、以前に報告した方法の培養部分の改良を試み、タブレット型培地を用いる事により簡単に検出操作まで行えるようになったことを報告する。

材料と方法

1. 対象

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 32 名(年齢: 18 歳, 男: 女=5:27)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)を得て行った。

2. タブレット型培地の作製

9 g の mitis salivarius agar (BD 社) と 15 g のスクロース (Wako 社) を混ぜ、蒸留水で 100 mL にメスアップし、オートクレーブ (121°C, 15 min) にかけて。オートクレーブ終了後、固まらない程度に冷めた培地に Tellurite solution を 100 µL と Bacitracin (400 U/ml) を 50 µL 加えた。攪拌

著者連絡先: (〒737-0112) 広島県呉市広古新開 5-1-1  
広島国際大学健康科学部医療栄養学科  
長嶺憲太郎  
TEL: 0823-73-8995  
E-mail: k-nagami@hirokoku-u.ac.jp

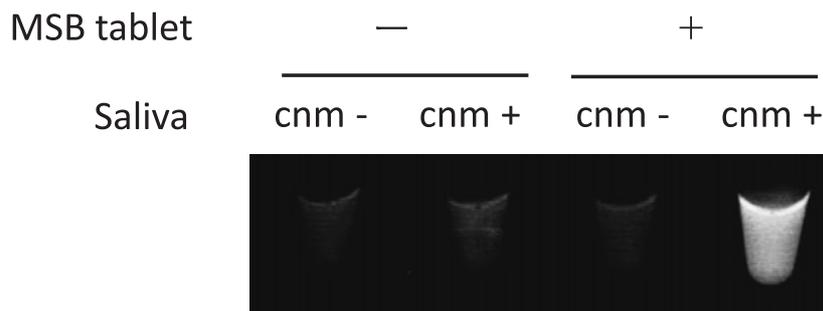
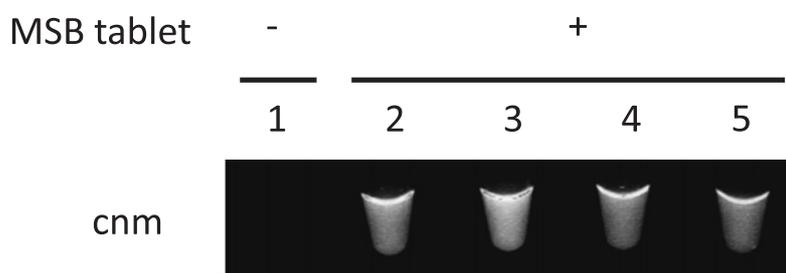


図1. タブレット型培地による *cnm* 陽性 *S. mutans* の検出

タブレット型培地を用いない場合は *cnm* (+) および *cnm* (-) *S. mutans* はいずれも検出されなかった。タブレット型培地を用いて培養すると *cnm* (-) *S. mutans* では検出されなかったが、*cnm* (+) *S. mutans* で *cnm* 遺伝子が検出された。

(a)



(b)



図2. 唾液に関する検討

(a) 培地に加える唾液量を 150  $\mu$ L (2), 500  $\mu$ L (3), 1000  $\mu$ L (4), 1500  $\mu$ L (5), 培地なし (1) で *cnm* 遺伝子を検出したところ、培地に 150  $\mu$ L の唾液があれば検出できた。(b) 唾液を希釈して検出限界を検討したところ、10 倍希釈で検出が可能であった。(1) 培地なし、唾液原液 (2) 培地あり、10<sup>4</sup> 倍希釈 (3) 培地あり、10<sup>3</sup> 倍希釈 (4) 培地あり、10<sup>2</sup> 倍希釈 (5) 培地あり、10 倍希釈。

後、20 mL の培地を 10 cm シャーレに注ぎ入れ、培地が固まるまで静置した。パスツールピペットの上部 (スポイトを挿す部分) をシャーレ中の MSB 寒天培地に押し当て、タブレット状の MSB 寒天培地を取り出し、これをタブレット型培地とした。

### 3. タブレット型培地の凍結乾燥

2 mL マイクロチューブに入れたタブレット型培地を -82°C で 1 時間凍結させたのち、凍結乾燥機 (EYELA FDU-1200, 東京理化工機) を用いて 22 時間減圧処理し凍結乾燥した。

### 4. *Cnm* 遺伝子検出

タブレット型培地に唾液 200  $\mu$ L を混合し、37°C の恒温槽中に静置した。培養 1 日後、培養液 2.5  $\mu$ L を用いて、プロ

トコルに従い LAMP 法で *cnm* 遺伝子を増幅した<sup>9)</sup>。すなわち、DNA 増幅試薬 D (栄研化学) の試薬入りチューブに、終濃度が 0.8 M ベタイン、0.8  $\mu$ M FIP および BIP、0.4  $\mu$ M LF および LB、0.2  $\mu$ M F3 および B3、1  $\times$  蛍光目視検出試薬 (栄研化学) となるように加え、2.5  $\mu$ L の培養液および蒸留水で 25  $\mu$ L に調整した。蓋を閉めた後、転倒混和しチューブ内の試薬と混和した。LAMP 反応は、*cnm* (+) *S. mutans* の検出は 65°C で、*S. sobrinus* 菌の検出は 63°C で行った。

*cnm* (+) *S. mutans* および *S. sobrinus* 菌増幅用プライマーは以下の通りである。*cnm* (+) *S. mutans* プライマー; F 3 : CCAGTAATACTGTCATTGAAAGT, B 3 : CGCTTTGAGTTTGATGAGC, FIP : AACCATTAAGCTGGAGGTTTCAGGAACCTGCTTTGTCTTGCGT, BIP : CGT

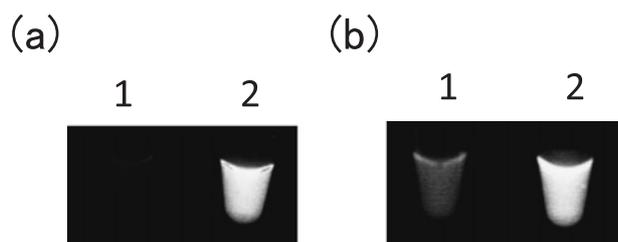


図3. タブレット型培地保管条件の検討

(a) 凍結乾燥培地を $-20^{\circ}\text{C}$ 、6ヶ月間保管後、*cnm* (+) *S. mutans* の唾液を培養し、凍結乾燥培地で*cnm* 遺伝子の検出を確認できた。(1) 凍結乾燥培地なし、唾液あり、(2) 凍結乾燥培地あり、唾液あり。(b) 凍結乾燥培地を $-20^{\circ}\text{C}$ 、1年間保管後、*cnm* (+) *S. mutans* の唾液を培養し、凍結乾燥培地で*cnm* 遺伝子の検出を確認できた。(1) 凍結乾燥培地なし、唾液あり、(2) 凍結乾燥培地あり、唾液あり。

ATAACCTGTTCTCTGACTGTAATATTTAAAGCAGGC  
GACAC, LF : GCAAGTATGTTGGTGATTTG, LB :  
CCTGAATTCTGCCAGTTAAC, *S. sobrinus* プライマー ;  
F3 : GGGAGGCTCAAAGGAAGT, B3 : GATGATTTG  
CTCATCATAGTCTG, FIP : GGTAGCAAAGGTTAA  
ATAGCCCATCGCTATTTTTACTGCTACAGC, BIP : T  
GCTTCTCTCTTATCAGTATCGGTCTTTATGACCA  
GTTGTGCGA, LF : TCCTACGGCAATGCCAATG, LB :  
TTGGTCAACACACTAGAACCCG。

## 結 果

### 1. タブレット型培地を用いた *S. mutans* 培養および *cnm* の発現

タブレット型培地を用いない場合は、*cnm* (-) および *cnm* (+) *S. mutans* を含む唾液を培養しても *cnm* 遺伝子はいずれも検出できなかった。タブレット型培地を用いた場合は、*cnm* (-) *S. mutans* を含む唾液の培養液からは *cnm* 遺伝子は検出されず、*cnm* (+) *S. mutans* を含む唾液の培養液のみ *cnm* 遺伝子を確認した (図1)。

### 2. 添加する唾液量に関する検討

培地に加える唾液量を0, 150, 500, 1000 および 1500  $\mu\text{L}$  添加し、1日培養後 *cnm* 遺伝子を検出したところ、培地に150  $\mu\text{L}$  の唾液があれば検出できることが示され、少量の唾液でも検出できることが分かった (図2a)。また、唾液を希釈して検出限界を検討したところ、10倍希釈で検出が可能であったが、それ以上希釈すると *cnm* 遺伝子は検出できなかった (図2b)。

### 3. 培地保管条件の検討

凍結乾燥培地を $-20^{\circ}\text{C}$ 、6ヶ月間保管後、*cnm* (+) *S. mutans* の唾液を培養し、凍結乾燥培地で *cnm* 遺伝子の検出を確認できた (図3a)。また、凍結乾燥培地を $-20^{\circ}\text{C}$ 、1年間保管後も、*cnm* (+) *S. mutans* の唾液を培養し、凍結乾燥培地で *cnm* 遺伝子の検出を確認できた (図3b)。

### 4. ボランティア検体を用いた検討

ボランティアの安静時唾液 200  $\mu\text{L}$  をタブレット型培地で培養し、*cnm* (+) *S. mutans* の検出を行ったところ、7名 (21.8%) が陽性であった (図4)。



図4. ボランティア検体を用いた検討

ボランティアの安静時唾液 200  $\mu\text{L}$  をタブレット型培地で培養し、*cnm* (+) *S. mutans* の検出を行ったところ、7名 (21.8%) が陽性であった。

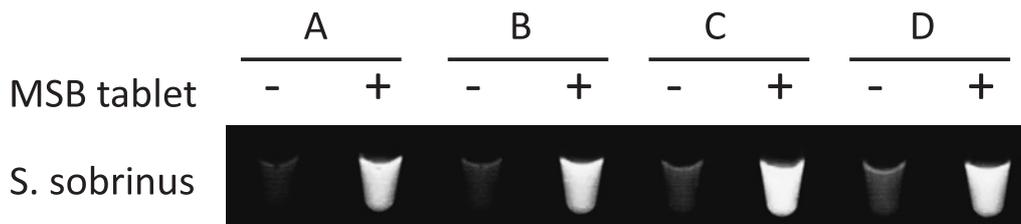
### 5. タブレット型培地による *S. sobrinus* の検出

ミュータンス連鎖球菌のひとつである *S. sobrinus* についても同様の方法で遺伝子検出可能であるかを検討するために *S. sobrinus* 含有唾液 4 検体用いて検討を行った。この結果、タブレット型培地を用いない場合はすべて *S. sobrinus* 遺伝子は検出されず、タブレット型培地を用いて培養すると 4 検体すべて *S. sobrinus* が検出された (図5)。

## 考 察

う蝕や歯周病の治療だけが歯科医療と捉えられていた時代は変わり、歯の健康を維持することが全身の健康や医療費の削減に繋がるとの考えが普及してきた<sup>9)</sup>。最近では歯科検診による口腔の状態のチェックを行い、必要なケアを早期に行うことが大切であると国民に働きかける動きもある。一方、口腔検査についてはX線検査や歯周ポケットの深さを測定する、あるいは歯垢の付着状況を調べる plaque control record を検査指標としており、細菌学的検査や遺伝子検査については歯科医院で行えるレベルには至っていない。

う蝕原性細菌の一つとして知られていた *S. mutans* のうち *cnm* 遺伝子陽性 *S. mutans* は脳内微小出血や感染性心内膜炎と関連があること<sup>8)-10)</sup>や歯周病原細菌と全身疾患との関連<sup>6,7)</sup>については次々に新しい関係性が示されており、歯科医療においてもこれらの菌の保菌者に対して、非保菌者と異なる対応が必要であると考えた。そこで、我々は歯科医院で簡

図5. タブレット型培地による *S. sobrinus* の検出

*S. sobrinus* 含有唾液4検体 (A-D) とともにタブレット型培地を用いない場合は *S. sobrinus* は検出されず、タブレット型培地を用いて培養すると *S. sobrinus* が検出された。

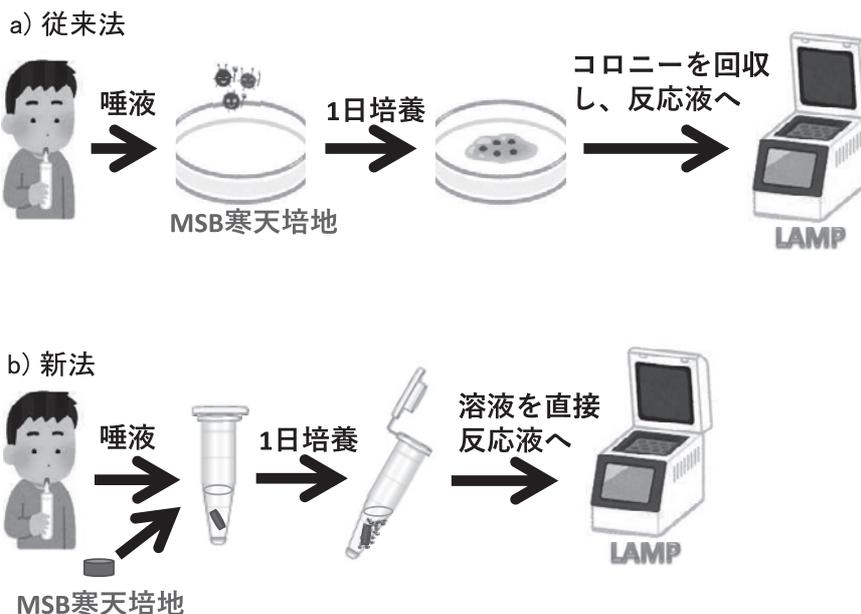


図6. タブレット型培地による検出時間の短縮

(a) 従来法は、MSB寒天プレート培地からコロニーを回収し、LAMP法によって *cnm* (+) *S. mutans* を検出していたが、(b) 新法はタブレット型培地に唾液を添加・培養し、唾液からLAMP法によって *cnm* (+) *S. mutans* の検出が可能となった。

単に取り入れることができる検査方法を確立し、改良を行ってきた。今回の研究では培養した唾液を用いて、採取から最短2日で迅速にかつ感度のよい *cnm* 遺伝子陽性 *S. mutans* の検出に成功した(図1, 2)。本法では、タブレット型培地を唾液のような液体状のサンプルで覆った状態で培養することにより、タブレット型培地表面部分が適度に嫌気性になり、唾液中の嫌気性細菌が効率よく増殖したと考える。しかしながら、今回用いたミュータンス連鎖球菌は、通性嫌気性細菌であることから、嫌気性条件だけでなく好気性条件でも増幅が可能である。このことから、本法は、嫌気性菌のみならず好気性菌の増殖にも有用な方法であることが考えられる。

また、本法では遺伝子の検出にLAMP法を用いることで、DNA抽出なしにクルードなサンプルから検出することが可能となるため煩雑な操作が無くなった。また、唾液を10倍程度希釈した菌量でも検出できることが分かり、菌体数が少ない人からでも容易に検出できることが分かった(図2b)。今回はさらに多くのサンプルに対してより容易に扱いやすく対応できるように、タブレット型培地を作製し、チューブの中に入れておき唾液を200 μL加えるだけで培養ができるよ

うにした(図6)。ボランティア32名の唾液を用いた結果は陽性率が21.8%という結果であったが、検体数が少ないためこれまでの結果と単純に比較することができない。本法は多検体検出に好適であることから、今後は検体数を増やすことにより本法の正確性を評価していきたい。

また、同じタブレット培地を用いて *S. mutans* と同様にう蝕原性細菌の一つとされる *S. sobrinus* も増殖させ、容易に検出できるようにした(図5)。これは、タブレット型培地が様々な種類の細菌に対応できる可能性を示唆するものである。これまで通性嫌気性であるミュータンス連鎖球菌の培養ではMSB培地をプレート状に作製し、嫌気システムとしてアネロパウチなどを使用して嫌気状態にして培養を行っていた。また、数日培養して増殖したコロニーは培地に比較的強固に結合しやすく、菌の採取が煩雑になりやすかった。本法では唾液をチューブに加えて培養し、そのままコロニーを採取し、LAMP法を行うことでより簡潔に作業が行えるようになった。さらに、使用したサンプルもそのまま保管、破棄できるため衛生的でもある。

タブレット型培地を乾燥凍結し、保管半年後、および1年

後で検出感度に影響するかを検討したところ、1年後においても良好な結果となった(図3)。よって、本法は菌の遺伝子の検出が簡便に短時間ででき、多数のサンプルを処理するのに適しているだけでなく、採取材料の取り扱いも容易であり、開業医院でも扱いやすい検出方法であるといえる。

今後は全身疾患との関連が報告される偏性嫌気性菌の歯周病原細菌<sup>11)~13)</sup>など本法で扱える菌の種類を増やし、病院や歯科医院、集団検診などで口腔内細菌を検査できるようになれば、病気の早期発見・治療が可能となるかもしれない。

**謝辞:** 本研究はJSPS 科研費 JP20K02352 (長嶺), JP22K11894 (木村), JP20K09940 (北川) の助成を受けたものです。

**利益相反:** 申告すべき利益相反なし

## 文 献

- 1) Watanabe, I., N. Kuriyama, F. Miyatani, et al. 2016. Oral *cnm*-positive *Streptococcus mutans* expressing collagen binding activity is a risk factor for cerebral microbleeds and cognitive impairment. *Sci. Rep.* 6: 38561.
- 2) 仲野和彦, 大島 隆. 2010. 口腔細菌における循環器疾患に対する病原性の追究—*Streptococcus mutans* における研究成果を足がかりに—. *小児歯誌* 48 (1): 1-10.
- 3) Nakano, K., K. Hokamura, N. Taniguchi, et al. 2011. The collagen-binding protein of *Streptococcus mutans* is involved in haemorrhagic stroke. *Nat Commun.* 2: 485.
- 4) Kitagawa, M., K. Nagamine, H. Oka, et al. 2020. Rapid detection of the *Streptococcus mutans* *cnm* gene by loop-

- mediated isothermal amplification. *Anal Biochem.* 605: 113812.
- 5) 井上 孝. 2009. 歯科医から口腔医への架け橋. *歯科学報* 109: 4-5.
- 6) 村山洋二, 西村英紀, 岩本義博, 他. 2003. 歯周病と全身疾患—歯周病の病態から—. *日歯周誌* 45 (4): 325-348.
- 7) 山崎和久. 2018. 歯周病と非感染性疾患・慢性疾患との関連. *生物試料分析* 41 (3): 135-141.
- 8) Nakano, K., R. Nomura, N. Taniguchi, et al. 2010. Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains containing the *cnm* gene encoding a collagen-binding adhesin. *Arch. Oral Biol.* 55: 34-39.
- 9) Nakano, K., J. Lapirattanakul, R. Nomura, et al. 2007. *Streptococcus mutans* clonal variation revealed by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2616-2625.
- 10) Nomura, R., K. Nakano, N. Taniguchi, et al. 2009. Molecular and clinical analyses of the gene encoding the collagen-binding adhesin of *Streptococcus mutans*. *J. Med. Microbiol.* 58: 469-475.
- 11) Preshaw, P. M., A. L. Alba, D. Herrera, et al. 2012. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia.* 55 (1): 21-31.
- 12) Stein, P. S., M. J. Steffen, C. Smith, et al. 2012. Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers. Dement.* 8 (3): 196-203.
- 13) Bender, P., W. B. Bürgin, A. Sculean, et al. 2017. Serum antibody levels against *Porphyromonas gingivalis* in patients with and without rheumatoid arthritis — a systematic review and meta-analysis. *Clin. Oral. Investig.* 21 (1): 33-42.

## Genetic detection of oral bacteria using tablet medium

Kentaro Nagamine<sup>1)</sup>, Rumi Kimura<sup>1)</sup>, Masae Kitagawa<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Clinical Nutrition, Faculty of Health and Wellness Science, Hiroshima International University

<sup>2)</sup>Department of Oral Maxillofacial Pathobiology, Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University

Some oral bacteria are involved in systemic diseases as well as oral diseases such as dental caries and periodontal disease. Detection and identification of these oral bacteria from saliva requires culture of the bacteria, DNA extraction from the bacteria, and confirmation by PCR. In this study, we aimed to simplify the operation from saliva sampling to detection by improving the saliva culture method and combining it with the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. A tablet-shaped solid medium, named tablet medium, and saliva sampled from the oral cavity are mixed in a microtube and left in a constant temperature bath at 37°C for one day, and as a result, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* were able to grow. The next day, *S. mutans* and *S. sobrinus* could be amplified directly from the cultured saliva for LAMP reaction without DNA extraction. This method is suitable for processing a large number of samples easily and quickly, and is expected to be used for general-purpose detection of oral bacteria in hospitals, dental clinics, and group examinations.