

菌株レベルでの病原性解析を可能とする

*P. gingivalis* および *T. forsythia* の分離・定量法の確立

洪 性文 續橋 治 淵上 真奈\*

日本大学松戸歯学部 口腔健康科学講座 歯科臨床検査医学分野

〒271-8587 千葉県松戸市栄町西 2-870-1

## Abstract

*Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* are regarded as a key factor in periodontal disease. A suitable selective medium for the isolation and quantification of *P. gingivalis* and *T. forsythia* has been needed for the pathogenic analysis at bacterial strain level. The purpose of present study was to develop the selective medium for the isolation and quantification of *P. gingivalis* and *T. forsythia*. A novel selective medium, designated PGTFSM, was developed for the isolation of these organisms. Using PGTFSM, the proportion of these organisms in gingival crevicular fluid samples collected from 30 periodontally healthy subjects and 30 patients with chronic periodontitis. PGTFSM was able to easily distinguish each bacterial species by the differences in each colony morphology. *P. gingivalis* and *T. forsythia* were detected in 3 (10%) and 5 (16.7%) periodontally healthy subjects, respectively. On the other hand, *P. gingivalis* and *T. forsythia* were detected in 18 (60%) and 28 (93.3%) patients with chronic periodontitis, respectively. The detection sensitivity of the culture method using PGTFSM was equivalent to that of the PCR method. It was indicated that PGTFSM was useful for the isolation and quantification of *P. gingivalis* and *T. forsythia*.

Keywords: selective medium, red complex, *Porphyromonas gingivalis*,

*Tannerella forsythia*

## 抄 録

目的：歯周病の発症・進行に最も関連が深い *P. gingivalis* と *T. forsythia* を確実にかつ同時に分離可能な選択培地の開発を試みた。

方法：開発した選択培地（PGTFSM）を用いて慢性歯周炎患者および健常者各 30 名の歯肉溝滲出液試料から両菌種の検出を試みた。

結果および結論：両菌種は PGTFSM 上でそれぞれ特徴的な集落形態を示すことより、2 菌種を判別することが可能であった。健常者では *P. gingivalis* は 3 名（10%）、*T. forsythia* は 5 名（16.7%）から検出された。慢性歯周炎患者では *P. gingivalis* は 18 名（60%）、*T. forsythia* は 28 名（93.3%）の被験者から検出された。PGTFSM を用いた培養法による検出感度は、PCR 法と比較して同等であった。これらの結果から、PGTFSM は両菌種を分離・定量するのに有用であると考えられた。

Key word : Selective medium, red complex, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*

## 緒 言

歯周炎は歯周局所における正常細菌叢バランスが破綻した結果、病的な細菌叢に変遷し、それらにより形成された細菌塊（*dysbiotic biofilms*）によって引き起こされる歯槽骨の吸収を伴う歯周組織の炎症性病変である<sup>1)</sup>。歯周病関連細菌についてはこれまで多く研究報告がなされており、特に *red complex* と名付けられた特定の細菌種、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)、*Treponema denticola* (*T. denticola*)、*Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) が重度の歯周炎と有意に関連していることが明らかにされている<sup>2)</sup>。その中でも *P. gingivalis* は、歯周局所における正常細菌叢コミュニティを攪乱して歯周組織に慢性炎症を引き起こすのに重要な役割を果たす細菌種 (*keystone pathogen*) と見做されている。しかし、歯周病は医科領域における細菌感染とは異なり、*Koch* の原則が適応されない非常にユニークな疾患で、起炎菌が存在してもその細菌に対応した臨床症状を呈するわけではない。また、歯周病関連細菌は健康な歯周組織の歯肉溝からも検出されることもあり、細菌の存在が歯周病の発症とは必ずしも一致しない場合もある。しかしながら、歯周病関連細菌、特に *P. gingivalis* や *T. forsythia* などの *red complex* の分布状況を検索することが、現時点においては歯周病の詳細な進行実態を把握する上で重要であると考えられる<sup>3)</sup>。

現在、歯科臨床の場において活用されている歯周病細菌検査は、*red complex* を含む歯周病関連細菌を定性的に検出する PCR 法<sup>4)</sup>や定量的に検出するリアルタイム PCR 法 (qPCR)<sup>3)</sup>などによる遺伝子学的手法を用いた菌種レベルの解析が主流である。一方で、*P. gingivalis* には 6 つの線毛遺伝子 *fimA* の型があり、その中で II 型が重度歯周病患者から高頻度で分離されることから、II 型線毛を保有する *P. gingivalis* の病原性が強いことが示唆されている<sup>5,6,7)</sup>。*P. gingivalis* と同様に *T. forsythia* においても、同一の菌種であっても菌株によって病原性が異なることが推定され、菌種レベルでの定性・定量を主とした解析では、歯周疾患に対

する精度の高いリスク評価や病態の把握は出来ないことが窺われる。すなわち、細菌の持つ能力や病原因子は、感染力、環境適応能力、毒素産生性等々、多岐にわたり複雑で、同一細菌内の株によっても多様性（diversity）を示すため、特定細菌の定性・定量解析では現在の歯周病の重症度や進行の程度を把握することは困難であり、菌株レベルでの病原性解析が必要であると著者らは考えた。

菌株レベルの解析は、先述の *P. gingivalis* の線毛遺伝子である *fimA* の型判別が既に臨床応用されているが、その他にも同一の細菌種であっても、病原性と密接に関連し、また菌株間で差異を表す病原因子や病原マーカが存在すると考えられる。それらを検知・定量可能となれば歯周病に対して高い特異性をもった検査法を確立でき、本疾患の診断・治療・予防に有効なツールとなり得ると推定される。菌株レベルの検索・解析を行うためには、分離菌株が必要となる。即ち、歯周病罹患の有無や程度が異なる多数の被験者から試料を採取、選択培地を用いた培養法により細菌株を分離、得られた分離菌株における病原性状と被験者の病態を比較検討することにより、疾患特異的な指標となり得る病原マーカ-の検索・解析が可能となる。

現在まで、重度歯周炎と有意な相関を認める *P. gingivalis* または *T. forsythia* を確実に分離可能な選択培地は未だ開発されていない。そこで著者らは、歯肉溝滲出液試料（GCF）から *P. gingivalis* と *T. forsythia* 両菌種を高精度、かつ同時に分離・定量可能な選択培地を開発し、*P. gingivalis* と *T. forsythia* の分離・定量法の確立を試みた。それにより、菌株レベルでの解析、すなわち病原マーカ-の検索・解析が可能となる。これにより、歯周病に対して疾患特異的な病原マーカ-が特定されれば、単なる細菌数の定量ではなく病原因子の定量がチェアサイドで可能となり、歯周病の診断や治療効果の即時判定に有用であると考えられる。また本研究では、慢性歯周炎患者と歯周組織が健常な被験者（歯周健常者）から GCF を採取し、本選択培地による培養法、また本研究で確立した Direct Multiplex PCR

法の 2 つの方法を用いて、GCF 試料中から *P. gingivalis* および *T. forsythia* の検出を試み、それぞれの検出結果に対して比較検討を行った。

## 材料および方法

### 1. 供試菌と培養方法

表 1、2 に示した細菌株を実験に供した。偏性嫌気性菌 (*Porphyromonas* 属、*Tannerella* 属、*Prevotella* 属および *Fusobacterium* 属) は CDC 嫌気性菌用血液寒天培地 (CDC 血液寒天培地 : Tryptic soy agar (Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD, USA)、ビタミン K<sub>1</sub> (10 µg/ml)、ヘミン (5 µg/ml)、L-システイン (800 µg/ml)、0.5 % yeast extract、5 % 羊血液) を継代用培地として用いた。さらに、*T. forsythia* の培養には、本菌が発育因子として N-アセチルムラミン酸を要求するため、CDC 血液寒天培地上中央に直径 1 cm 大のペーパーディスクを置き、1.5 % N-アセチルムラミン酸 (20 µl) をディスクに浸み込ませた。これら細菌株の培養は 37 °C、48 時間、AnaeroPack<sup>®</sup> (三菱ガス化学) によるガスパックシステムを用いた嫌気培養にて行った。NUM-Pg 9020、NUM-Tf 9503 および NUM-Tf 9505 は、著者らが以前行った研究において、非選択培地である CDC 寒天培地を用いて分離された細菌株である。偏性嫌気性菌以外の細菌株の培養は CDC 血液寒天培地を用いて、37 °C、24 時間、5 % CO<sub>2</sub> に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーター (NAPCO<sup>®</sup> Model 5400 ; Precision Scientific, Chicago, IL, USA) にて行った。

### 2. 抗菌薬に対する薬剤感受性試験

*P. gingivalis* および *T. forsythia* 菌株の薬剤感受性試験はディスク拡散法 (Sensi-Disk, Becton Dickinson Co., MD, USA) および希釈法を用いて行った<sup>8)</sup>。

### 3. 本研究で開発した選択培地の *P. gingivalis* および *T. forsythia* の回収率

10 %羊血清と 1.5 % N-アセチルムラミン酸 (20  $\mu$ l) を添加した OTEB 液体培地 (Anaerobe systems, Morgan Hill, CA, USA) にて 37  $^{\circ}$ C、48 時間、5 %CO<sub>2</sub> インキュベーターにて前培養した供試菌液を 0.9 mL PBS (0.01 M pH7.2) にて 10 倍段階希釈し、その菌液 100  $\mu$ l を本研究で開発した選択培地および CDC 血液寒天培地に塗抹し、37  $^{\circ}$ C、7 日間、AnaeroPack<sup>®</sup>によるガスパックシステムを用いた嫌気培養にて行った。培養後、形成された集落数から集落形成単位 (colony forming units ; CFU) を算定し、選択培地の *P. gingivalis* および *T. forsythia* の回収率を CDC 血液寒天培地と比較することにより求めた。

#### 4. 被験者、試料採取および培養法

歯周健常者、すなわち全ての歯肉溝の深さが 2 mm 程度であり、付着の喪失のない歯周組織が健常な者 30 名 (平均年齢 23.2 歳 : 18 歳-33 歳) から、歯内療法用ペーパーポイント (JM ペーパーポイント ; 株式会社モリタ) により GCF を 10 秒間 2 回採取した。また、慢性歯周炎と診断されアタッチメントレベル 5mm 以上を 3 か所以上有し、レントゲンで骨吸収を認めた患者 30 名 (平均年齢 53.6 歳 : 39 歳 - 66 歳) のプロービング時の出血 (Bleeding on probing、以下 BOP) を伴う最も深い歯周ポケットから、同様に GCF を採取した。試料採取後、速やかに 300  $\mu$ l の滅菌 PBS (0.01 M pH 7.2) の入った滅菌チューブに試料を浸漬した。試料を氷冷しながら 20 秒間超音波処理 (50 W, 20 kHz, Astrason<sup>®</sup> System model XL 2020 ; Farmingda, NY, USA) にて分散後、10 倍段階希釈した各試料液 100  $\mu$ l を本研究で開発した選択培地に塗抹した。また、総菌数用培地として、CDC 血液寒天培地を使用した。培養は 37  $^{\circ}$ C、48 時間、AnaeroPack<sup>®</sup>によるガスパックシステムを用いた嫌気培養にて行った。なお、この研究は、日本大学松戸歯学部倫理審査委員会にて承認を受けた後に実施した (EC18-033)。

## 5. *P. gingivalis* および *T. forsythia* の菌種同定

選択培地上に発育した集落は一次鑑別として *P. gingivalis* および *T. forsythia* 様集落形態の確認、グラム染色によってグラム陰性桿菌であることを確認し、*P. gingivalis* および *T. forsythia* として集落数 (CFU) をそれぞれ算定した。算定後、*P. gingivalis* および *T. forsythia* 様集落を各試料あたり 5 菌株釣菌し、CDC 血液寒天培地にて純培養後、本研究で設計した *P. gingivalis* および *T. forsythia* に特異的な 16S rDNA のプライマーを用いた PCR 法により、菌種同定を行った。

## 6. Direct multiplex PCR 法による *P. gingivalis* および *T. forsythia* の検出

培養法で使用した残りの GCF 試料を用いて、本研究で設計した *P. gingivalis* および *T. forsythia* に特異的な 16S rDNA のプライマーを用いた Direct multiplex PCR 法により、GCF 試料から *P. gingivalis* および *T. forsythia* の検出を行った。

## 7. *P. gingivalis* および *T. forsythia* 特異的 16S rDNA プライマーの設計

両菌種特異的 PCR プライマーは、生命情報・DDBJ センター (大学共同利用法人 情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所) から得られた *P. gingivalis* および *T. forsythia* の 16S rDNA の配列に基づき、CLUSTAL W (Genome Net / 京都大学化学研究所バイオインフォマティクスセンター) を用いてマルチプル・シーケンス・アライメント解析を行うことにより設計した。その後、設計したプライマーの特異性は BLAST Search (同) により検索した。

## 8. Direct multiplex PCR 法の確立

Direct multiplex PCR 反応液組成は、各々のプライマー 4.0  $\mu$ l、10  $\mu$ l の 2×MightyAmp Buffer Ver.3 (タカラバイオ株式会社)、0.4  $\mu$ l の MightyAmp DNA Polymerase (タカラバイオ)、DNA 抽出処理を行わずに GCF 試料 5.6  $\mu$ l をそのま



ま PCR テンプレートとし、反応液総量を 20  $\mu$ l とした。PCR 条件と電気泳動は、我々が以前行った研究と同様の方法で行った<sup>9)</sup>。また、既知の細菌数を滅菌精製水にて段階希釈した試料液を PCR のテンプレートとして増幅の有無を確認することにより、本研究で設計した菌種特異的プライマーを用いた Direct multiplex PCR 法の検出限界を調査した。

## 結 果

### 1. 選択培地の組成

ディスク拡散法にて、*P. gingivalis* および *T. forsythia* 菌株が感受性を示さなかった抗菌薬は、phosphomycin、polymyxinB、mupirocin および kanamycin であった。最小発育阻止濃度 (MIC) はそれぞれ、1000 mg/l、250 mg/l、100 mg/l および 1000 mg/l であった。口腔内の常在菌叢の主要なメンバーである *Streptococcus* 属菌、*Actinomyces* 属菌、*Corynebacterium* 属菌、*Veillonella* 属菌および *Fusobacterium* 属菌などは、この様な高い濃度の phosphomycin、polymyxin、mupirocin および kanamycin に対して高い感受性を示した。これらの結果を踏まえて選択培地の組成を決定した。CDC 血液寒天培地を基礎培地とし、250 mg/l kanamycin、300 mg/l phosphomycin、50 mg/l polymyxin および 2 mg/l mupirocin を添加したものを選択培地とし、本選択培地を PGTFSM と命名した。さらに還元系発色色素である塩化トリフェニルテトラゾリウム (TTC) 試薬を用いることにより、培地上に形成された *T. forsythia* のコロニーが暗紫色を呈し、コロニーの識別が容易になるところから 25 mg/l TTC を添加した。基礎培地をオートクレーブで滅菌後、50  $^{\circ}$ C に冷却し各抗生物質および TTC 試薬を加入した。また、*T. forsythia* を良好に発育させるために、試料を PGTFSM に塗抹後、培地上中央に直径 1 cm 大のペーパーディスクを置き、1.5 % N-アセチルムラミン酸 (20  $\mu$ l) をディスクに浸み込ませた後、培養を行った。

## 2. Direct multiplex PCR 法による *P. gingivalis* および *T. forsythia* の同定と検出

本研究で設計した *P. gingivalis* および *T. forsythia* 特異的 16S rDNA プライマーを表 3 に示す。*P. gingivalis* および *T. forsythia* の増幅サイズは、338 bp および 959 bp であった。本方法による両菌の検出限界は、PCR テンプレート 5.6  $\mu$ L あたり 5 cells 以上であった。*P. gingivalis* 株、*T. forsythia* 株、両菌の同属菌種および代表的な口腔細菌および両菌が検出された GCF 試料における本方法を用いた同定・検出結果を図 1 に示す。*P. gingivalis* 株と *T. forsythia* 株は、それぞれ 338 bp および 959 bp に増幅物を認めた。また、両菌の同属菌種および代表的な口腔細菌は増幅物を認めなかった。さらに、GCF 試料では *P. gingivalis* と *T. forsythia* の増幅サイズに相当する増幅物を全く認めないもの、*P. gingivalis* と *T. forsythia* の増幅サイズである 338 bp と 959 bp の 2 つの増幅物を認めるもの、*P. gingivalis* の増幅サイズのみを認めるもの、また *T. forsythia* の増幅サイズのみを認めるものと明瞭に判別することが可能であった。

## 3. PGTFSM における *P. gingivalis*、*T. forsythia* および代表的な口腔細菌の回収率

CDC 血液寒天培地と比較した PGTFSM での *P. gingivalis* および *T. forsythia* の回収率を表 1 に示す。全ての *P. gingivalis* および *T. forsythia* 株において PGTFSM での回収率（平均 97.1%）は良好であった。また、PGTFSM における両菌の同属菌種および代表的な口腔細菌の発育抑制率を表 2 に示す。PGTFSM は、これら細菌株の発育を著しく抑制した。

## 4. PGTFSM を用いた GCF 試料からの *P. gingivalis* および *T. forsythia* の検出状況

PGTFSM を用いた歯周健常者と慢性歯周炎患者の GCF からの *P. gingivalis* および *T. forsythia* の検出状況を表 4 に示す。歯周健常者と慢性歯周炎患者から採取

した GCF における総細菌数は、 $1.70 \times 10^6$  CFU/ml および  $7.99 \times 10^6$  CFU/ml であった。歯周健常者において、*P. gingivalis* 数は  $2.3 \times 10^3$  CFU/ml で総細菌数に対するその割合は 0.13%、また *T. forsythia* 数は  $8.7 \times 10^2$  CFU/ml で総細菌数に対するその割合は 0.05%であった。一方、慢性歯周炎患者においては、*P. gingivalis* 数は  $2.1 \times 10^5$  CFU/ml で総細菌数に対するその割合は 2.56%、また *T. forsythia* 数は  $7.1 \times 10^4$  CFU/ml で総細菌数に対するその割合は 0.89%であった。慢性歯周炎患者は歯周健常者と比較して、総細菌数、*P. gingivalis* 数および *T. forsythia* 数が多く検出され、両菌種共に総細菌数に対する割合も高かった。

GCF 試料を接種・塗抹・培養後に PGTFMSM 上に形成した *P. gingivalis* と *T. forsythia* のコロニー像を図 2 に示す。PGTFMSM 上で、*P. gingivalis* は円形でブラウンがかかった黒色のスムーズコロニーを形成し、*T. forsythia* は *P. gingivalis* と比較して小さく、紫がかかった白色の円形で、中央が暗紫色を呈するスムーズコロニーを形成した。PGTFMSM 上で、特徴的な集落外観を呈する両菌種のコロニーは、他の細菌のコロニーと容易に識別することが可能であった。

## 5. Direct Multiplex PCR 法と PGTFMSM を用いた培養法との検出比較

Direct Multiplex PCR 法と PGTFMSM を用いた培養法による歯周健常者と慢性歯周炎患者の GCF 試料からの *P. gingivalis* および *T. forsythia* の検出頻度を表 5 に示す。Direct Multiplex PCR 法と PGTFMSM を用いた培養法による両細菌の検出頻度に差は認められず、また各方法によって検出または未検出の被験者も同一であった。歯周健常者では *P. gingivalis* が単独で検出された者は 0 名 (0%)、*T. forsythia* が単独で検出された者は 2 名 (6.7%)、*P. gingivalis* と *T. forsythia* の両方が検出されたのは 3 名 (10%) であった。一方、慢性歯周炎患者では *P. gingivalis* が単独で検出された者は 2 名 (6.7%)、*T. forsythia* が単独で検出された者は 12 名 (40%)、*P. gingivalis* と *T. forsythia* の両方が検出されたのは 16 名 (53.3%) であり、歯周

健常者と比較して両菌種の検出頻度は高かった。また、両群において両菌種共に検出される傾向が強く、さらに *P. gingivalis* よりも *T. forsythia* の検出頻度が高かった。

## 考 察

歯肉縁下プラーク中のある特定の微生物群に感染した者のみがアタッチメントロスを伴う歯周炎に発展するのではないかと考え始められるようになって以来、それら特定の歯周病関連微生物に対して、多くの研究がなされてきた<sup>10)</sup>。その中でも、*P. gingivalis* は代表的な歯周病原細菌の一つであり、LPS、線毛、gingipain、外膜小胞など細胞傷害性を有する多くの病原因子をもつことが知られている<sup>11,12)</sup>。しかし、全ての *P. gingivalis* が同程度の歯周病原性を保有しているのではなく、歯周病原性は本菌の線毛遺伝子の型によって異なると考えられている。即ち、6種類の線毛遺伝子型のうち、最も歯周炎と関連を示すのはⅡ型であり、Ⅱ型線毛の歯周病原性は極めて高いとされている<sup>5,6,7)</sup>。また、限局性侵襲性歯周炎と強い関連性を示す *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* においても、本菌の有力な病原因子であるロイコトキシンの活性発現が菌株により異なることが判明している<sup>13)</sup>。一方、*T. forsythia* も、*P. gingivalis* と同様に重度歯周疾患者の歯周ポケット内から検出され、その病原性が注目されている。本菌が保有する病原因子は trypsin-like protease<sup>13)</sup>、sialidase SiaH<sub>4</sub><sup>14)</sup>および NanH<sup>15)</sup>、Karilysin<sup>16)</sup>などが報告されている。しかしながら、*T. forsythia* は培養や変異株の作製が困難であるため、未だ不明な点が多いのが現状である。また、同一の菌種であっても菌株によって病原性が異なることが推定される。そのため、現在主流である菌種レベルでの定性・定量を主とした解析では、歯周疾患に対する精度の高いリスク評価や病態の把握は出来ないことが窺われる。

現在、GCF などの口腔試料における歯周病原細菌の検出には、培養を行わず

に採取した試料から直接細菌 DNA を抽出し、遺伝子学的に目的とする細菌の有無を確認する PCR 法<sup>4)</sup>や菌量を定量する qPCR 法<sup>3)</sup>によるものが主流である。PCR 法は判定に要する時間が短く、多くの検体を一度に調査できるなどの利点がある。一方で、本方法は試料中の死菌も検出され、さらには検出に用いる PCR 用プライマーが、標的とする細菌のみに反応を示す特異性の高い遺伝子配列が求められる。そのため、厳密な手順で行わなければ positive-negative error の可能性は否定できない。また、PCR 法などの遺伝子学的手法を用いた検出方法では、標的細菌の phenotype、genotype および病原因子の検索や解析、また歯周治療を目的とした抗菌薬療法において有用な薬剤の選定を行うことはできない。故に、これらを成しえる為には単一の標的細菌を培養法により分離する必要がある、雑多な口腔試料から標的とする細菌を正確に分離するために選択培地が必須となる。

選択培地は、検体に存在する微生物のうち、特定の形質の微生物を意図的に優先または選択的に培養するための培地のことで、病原体の分離培養に用いられる。本方法は起因微生物を最終的に確定し、さらには薬剤感受性を明らかにすることが可能となり、抗菌薬療法に用いる薬剤の選定や薬剤耐性傾向を把握することが可能な非常に有用な手法である。故に選択培地を用いた分離培養法は、感染症の疫学を正しく把握するうえで重要であり、empiric therapy（経験的治療）の貴重な情報源ともなる<sup>17)</sup>。

これまで、*P. gingivalis* の分離には CDC 嫌気性菌用血液寒天培地に kanamycin と vancomycin が添加された偏性嫌気性グラム陰性桿菌の選択培地が使われてきた<sup>18)</sup>。しかしながら、本選択培地上には *P. gingivalis* を含む偏性嫌気性グラム陰性桿菌の全てが発育するために、選択性の問題から偽陰性を生じる可能性があり、本菌を確実に分離することが困難であった。すなわち、口腔には 700 菌種を超える細菌種が存在するため<sup>19)</sup>、雑多な細菌で占められる試料中からターゲットである *P. gingivalis* のみを本選択培地を用いて確実に検出・定量・分離することは

不可能であった。現在まで、*P. gingivalis* または *T. forsythia* を確実に分離可能な選択培地は未だ開発されていない。そこで著者らは、GCF などの口腔試料から *P. gingivalis* と *T. forsythia* 両菌種を高精度、かつ同時に分離・定量可能な選択培地を開発し、*P. gingivalis* と *T. forsythia* の分離・定量法の確立を試みた。CDC 血液寒天培地を基礎培地とし、これに kanamycin 250 mg/l、phosphomycin 300 mg/l、polymyxin 50 mg/l および mupirocin 2 mg/l を添加することにより選択性を向上させた。さらに、還元系発色色素である TTC 試薬 25mg/l を添加したものを選択培地 (PGTFSM) とした。TTC 添加により、培地上の *T. forsythia* のコロニーが暗紫色を呈して識別が容易となった。また、PGTFSM は CDC 血液寒天培地と比較して、*P. gingivalis* と *T. forsythia* の供試菌株で平均 97.1% と高い回収率を示した。さらに、PGTFM は *P. gingivalis* と *T. forsythia* 以外の本研究で用いた供試菌株の発育を顕著に抑制した。そのため、今回開発した PGTFM の選択性は優れていることが示された。

これまでに報告されている歯周健常者の GCF 試料における *P. gingivalis* の PCR 法による検出者率は、日本で 27.1 %<sup>20)</sup>、また国外で 14.3 %<sup>21)</sup>であり、今回の我々の結果 10 % と近似していた。一方、*T. forsythia* の PCR 法による検出者率は、国外で 10.5 %<sup>22)</sup> や 100 %<sup>21)</sup> と非常に幅があり、今回の我々の結果 16.7% は比較的低い傾向を認めた。また、これまでに報告されている慢性歯周炎患者の GCF 試料における *P. gingivalis* の PCR 法による検出者率は、国外で 36.4 %<sup>21)</sup> と今回の我々の結果 60 % は比較的高い傾向を示した。一方、*T. forsythia* の PCR 法による検出者率は、国外で 73.4 %<sup>22)</sup> や 100 %<sup>21)</sup> であり、今回の我々の結果 93.3 % と近似していた。被験者の人種の違いや PCR 法の手技や試薬などの違いが検出結果の違いに僅かな影響を及ぼしていると考えられる。また、これまでの報告と同様に慢性歯周炎患者と比較して歯周健常者では両菌種の検出頻度は高く<sup>21,22)</sup>、両菌種を含む red complex が歯周病の発症と進行に関与していることが伺われる。さらに

本研究では、両群において両菌種共に検出される傾向が見受けられた。このことは、*P. gingivalis* と *T. forsythia* は共生することにより歯周病の発症、進行、増悪に関与するという報告と一致している<sup>2)</sup>。

本研究で確立した Direct multiplex PCR 法による *P. gingivalis* および *T. forsythia* の同定と検出方法は、タカラバイオ社の Mighty amp®を用いることにより、DNA 抽出作業が不要となり、試料採取から結果が得られるまでに要する時間は 2 時間以内、また PCR チューブ一つの PCR 反応で同時に 2 菌種検出可能であるために簡易性に優れ、高精度かつ迅速な結果が得られる有用な手法であると考えられる。また、Direct Multiplex PCR 法と PGTFSM を用いた培養法による両細菌の検出頻度に差は認められなかったために、PGTFSM は高感度に両細菌を検出可能な優れたツールであることが示唆された。

細菌の持つ能力や病原因子は、感染力、環境適応能力、多種の毒素産生など多岐にわたり複雑で、同じ細菌内の株によっても多様性を示す。今後、我々が開発した PGTFSM により、菌株レベルでの解析、すなわち病原マーカーの検索・解析が進み、疾患特異的病原マーカーの特定に繋がることが期待される。それにより、単なる細菌数の定量ではなく病原因子の定量がチェアサイドで可能となり、歯周病の診断や治療効果の即時判定に有用な細菌検査が確立できると思われる。

## 参考文献

- 1) Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Tonetti MS: Periodontitis: consensus report of workgroup 2 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions, J Clin Periodont, 45: S162-S170, 2018
- 2) Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL: Microbial complexes in subgingival plaque, J Clin Periodont, 25: 134-144, 1998

- 3) Marín MJ, Ambrosio N, O'Connor A, Herrera D, Sanz S, Figuero E: Validation of a multiplex qPCR assay for detection and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque samples. Arch Oral Biol, 102: 199-204, 2019
- 4) Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J: Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions, Oral Microbiol Immunol, 11: 266-273, 1996
- 5) Nakagawa I, Amano A, Ohara-Nemoto Y, Endoh N, Morisaki I, Kimura S, Kawabata S, Hamada: Identification of a new variant of *fimA* gene of *Porphyromonas gingivalis* and its distribution in adults and disabled populations with periodontitis. J Periodontal Res, 37: 425-432, 2002
- 6) Missailidis CG, Umeda JE, Ota-Tsuzuki C, Anzai D, Mayer MP: Distribution of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with various periodontal conditions, Oral Microbiol Immunol, 19: 224-229, 2004
- 7) Van Der Ploeg JR, Giertsen E, Ludin B, Morgeli C, Zinkernagel AS, Gmur R: Quantitative detection of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in dental plaque, FEMS Microbiol Lett, 232: 31-37, 2004
- 8) Hirasawa M, Takada K: Susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* to cell wall inhibitors and development of a novel selective medium for *S. sobrinus*, Caries Res, 36: 155-160, 2002
- 9) Tsuzukibashi O, Uchibori S, Kobayashi T, Umezawa K, Mashimo C, Nambu T, Saito M, Hashizume-Takizawa T, Ochiai T: Isolation and identification methods of *Rothia* species in oral cavities, Microbiol Methods, 134: 21-26, 2017
- 10) Christersson LA, Zambon JJ, Genco RJ: Dental bacterial plaques. Nature and role in periodontal disease, Clin Periodontol, 8: 441-446, 1991



- 11) Olsen I, Lambris JD, Hajishengallis G: *Porphyromonas gingivalis* disturbs host-commensal homeostasis by changing complement function, J Oral Microbiol, 9: 1340085, 2017
- 12) Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA: Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*, Periodontol 2000, 20: 168-238, 1999
- 13) Haubek D, Poulsen K, westergaard J, Dahlen G, Kilian M: Highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in geographically wide-spread cases of juvenile periodontitis in adolescents of African origin, J Clin Microbiol, 34: 1576-1578, 1996
- 14) Grenier D: Nutritional interactions between two suspected periodontopathogens, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*, Infect Immun, 60: 5298-5301, 1992
- 15) Braham PH, Moncla BJ: Rapid presumptive identification and further characterization of *Bacteroides forsythus*, J Clin Microbiol, 30, 649-654, 1992
- 16) Thompson H, Homer KA, Rao S, Booth V, Hosie AH: An orthologue of *Bacteroides fragilis* NanH is the principal sialidase in *Tannerella forsythia*, 191: 3623-3628, 2009
- 17) Karim AY, Kulczycka M, Kantyka T, Dubin G, Jabaiah A, Daugherty PS, Thogersen IB, Enghild JJ, Nguyen KA, Potempa J: A novel matrix metalloprotease-like enzyme (karilysin) of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia* ATCC 43037, Biol Chem, 391: 105-117, 2010
- 18) Ndip RN, MacKay WG, Farthing MJ, Weaver LT: Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods, Pediatr Gastroenterol Nutr, 36: 616-622, 2003
- 19) van Winkelhoff AJ, J de Graaff: Vancomycin as a selective agent for isolation of

*Bacteroides*, J Clin Microbiol, 18:1282-1284, 1983

- 20) Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE: Defining the normal bacterial flora of the oral cavity, J Clin Microbiol, 43: 5721-5732, 2005
- 21) Yoshida Y, Suzuki N, Nakano Y, Shibuya K, Ogawa Y, Koga T: Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and *Porphyromonas gingivalis* in Japanese adults, Oral Microbiol Immunol, 18:135-139, 2003
- 22) van der Reijden WA, Bosch-Tijhof CJ, Strooker H, van Winkelhoff AJ: prfH in *Tannerella forsythensis* is not associated with periodontitis, J Periodontol, 77: 586-590, 2006

表1 PGTFMSM における *P. gingivalis* と *T. forsythia* の回収率

細菌株	CDC 血液寒天培地 CFU/ml× 10 <sup>8</sup>	PGTFMSM CFU/ml× 10 <sup>8</sup>	回収率 (%)
<i>P. gingivalis</i>			
ATCC 33277	1.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.1	98.9
JCM 8525	1.6 ± 0.3	1.6 ± 0.3	97.5
Strain 381	1.9 ± 0.3	1.8 ± 0.2	95.3
NUM-Pg 9020	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.3	94.5
<i>T. forsythia</i>			
JCM 10910	2.1 ± 0.2	2.0 ± 0.1	96.7
NUM-Tf 9503	3.1 ± 0.1	3.1 ± 0.3	98.7
NUM-Tf 9505	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.2	97.2

<sup>a</sup> Ave ± SD.

表 2 PGTFSM における代表的な口腔細菌の発育抑制率

細菌株	CDC 血液寒天培地	PGTFSM	回収率 %
	CFU/ml× 10 <sup>8</sup>	CFU/ml × 10 <sup>8</sup>	
<i>Porphyromonas endodontalis</i> ATCC 35406	1.1	0.003	<0.0 <sup>b</sup>
<i>Porphyromonas asaccharolyticus</i> JCM 6326	2.3	0	0
<i>Porphyromonas bennonis</i> JCM 16335	1.8	0	0
<i>Porphyromonas uenonis</i> JCM 13868	0.9	0	0
<i>Tannerella sp.</i> JCM 31301	0.2	0	0
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611	1.3	0	0
<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC 33563	0.5	0	0
<i>Fusobacterium nucleatum</i> JCM 8532	1.1	0	0
<i>Streptococcus oralis</i> ATCC 35037	1.5	0	0
<i>Streptococcus salivarius</i> JCM 5707	2.8	0	0
<i>Streptococcus anginosus</i> ATCC 11391	3.1	0.0009	<0.0 <sup>b</sup>
<i>Streptococcus mutans</i> NCTC 10449	5.5	0	0
<i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478	7.4	0	0
<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC 12104	1.2	0	0
<i>Actinomyces oris</i> ATCC 27044	2.5	0	0
<i>Actinomyces odontolyticus</i> ATCC 17929	2.2	0	0
<i>Corynebacterium matruchotii</i> ATCC10790	1.9	0	0
<i>Corynebacterium durum</i> ATCC22586	0.3	0	0
<i>N. sicca</i> ATCC 29256	2.8	0	0

<sup>b</sup> Less than  $1 \times 10^6$  CFU/ml.

表3 *P. gingivalis* および *T. forsythia* 特異的 16S rDNA プライマーの配列

Species	Primer	Sequence	Product size (bp)	Position	Accession number
<i>P. gingivalis</i>	PGF	ACAGAGGGGGATAACCCGTT	338	139-158	AB547661
	PGR	ATGCAATACTCGTATCGCC		476-458	
<i>T. forsythia</i>	TFF	GATGGTAGCAATACCTGTC	959	71-89	AB035460
	TFR	GACGCCCCGAAGGGAAGAAA		1029-1010	

表 4 PGTFSM を用いた歯肉溝滲出液試料からの *P. gingivalis* および *T. forsythia* の検出状況

	被験者数	総細菌数		<i>P. gingivalis</i>		<i>T. forsythia</i>	
		CDC 血液寒天培地	PGTFSM	総細菌数に 対する割合	PGTFSM	総細菌数に 対する割合	
		CFU/ml× 10 <sup>6</sup>	CFU/ml× 10 <sup>6</sup>	%	CFU/ml× 10 <sup>6</sup>	%	
歯周健全者	30	1.70 (1.0 - 3.1) <sup>a</sup>	0.0023 (0 - 0.05) <sup>a</sup>	0.13	0.00087 (0 - 0.01) <sup>a</sup>	0.05	
慢性歯周炎患者	30	7.99 (2.2 - 14.0) <sup>a</sup>	0.21 (0 - 1.6) <sup>a</sup>	2.56	0.07 (0 - 0.17) <sup>a</sup>	0.89	

<sup>a</sup> Range.

表 5 Direct Multiplex PCR 法と PGTFMSM を用いた培養法の検出比較

Species	歯周健常者 (N=30)		慢性歯周炎患者 (N=30)	
	PCR	培養法	PCR	培養法
	検出者数 (頻度; %)			
<i>P. gingivalis</i> alone	0 (0)	0 (0)	2 (6.7)	2 (6.7)
<i>T. forsythia</i> alone	2 (6.7)	2 (6.7)	12 (40)	12 (40)
<i>P. gingivalis</i> + <i>T. forsythia</i>	3 (10)	3 (10)	16 (53.3)	16 (53.3)
検出なし	25 (83.3)	25 (83.3)	0 (0)	0 (0)



図1 Direct multiplex PCR 法による *P. gingivalis* および *T. forsythia* の同定と検出

Primers are a mixture of PGF, PGR, TFF, and TFR.

Lanes: 1, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277; 2, *Tannerella forsythia* JCM 10910; 3, *P. endodontalis* ATCC 35406; 4, *P. asaccharolyticus* JCM 6326; 5, *P. bennonis* JCM 16335; 6, *P. uenonis* JCM 13868; 7, *Tannerella* sp. JCM 31301; 8, *Prevotella intermedia* ATCC 25611; 9, *P. nigrescens* ATCC 33563; 10, *Fusobacterium nucleatum* JCM 8532; 11, *Streptococcus oralis* ATCC 35037; 12, *S. salivarius* JCM 5707; 13, *S. mutans* NCTC 10449; 14, *Corynebacterium matruchotii* ATCC 14266; 15, *C. durum* ATCC 33449; 16, *Neisseria sicca* ATCC 29256; 17, *Veillonella parvula* JCM 12972; 18, *V. dispar* DSM 20735; 19, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384; 20, *P. gingivalis* and *T. forsythia* negative sample; 22, *P. gingivalis* and *T. forsythia* positive sample; 23, *P. gingivalis* positive sample; 24, *T. forsythia* positive sample. M, molecular size marker (100-bp DNA ladder).



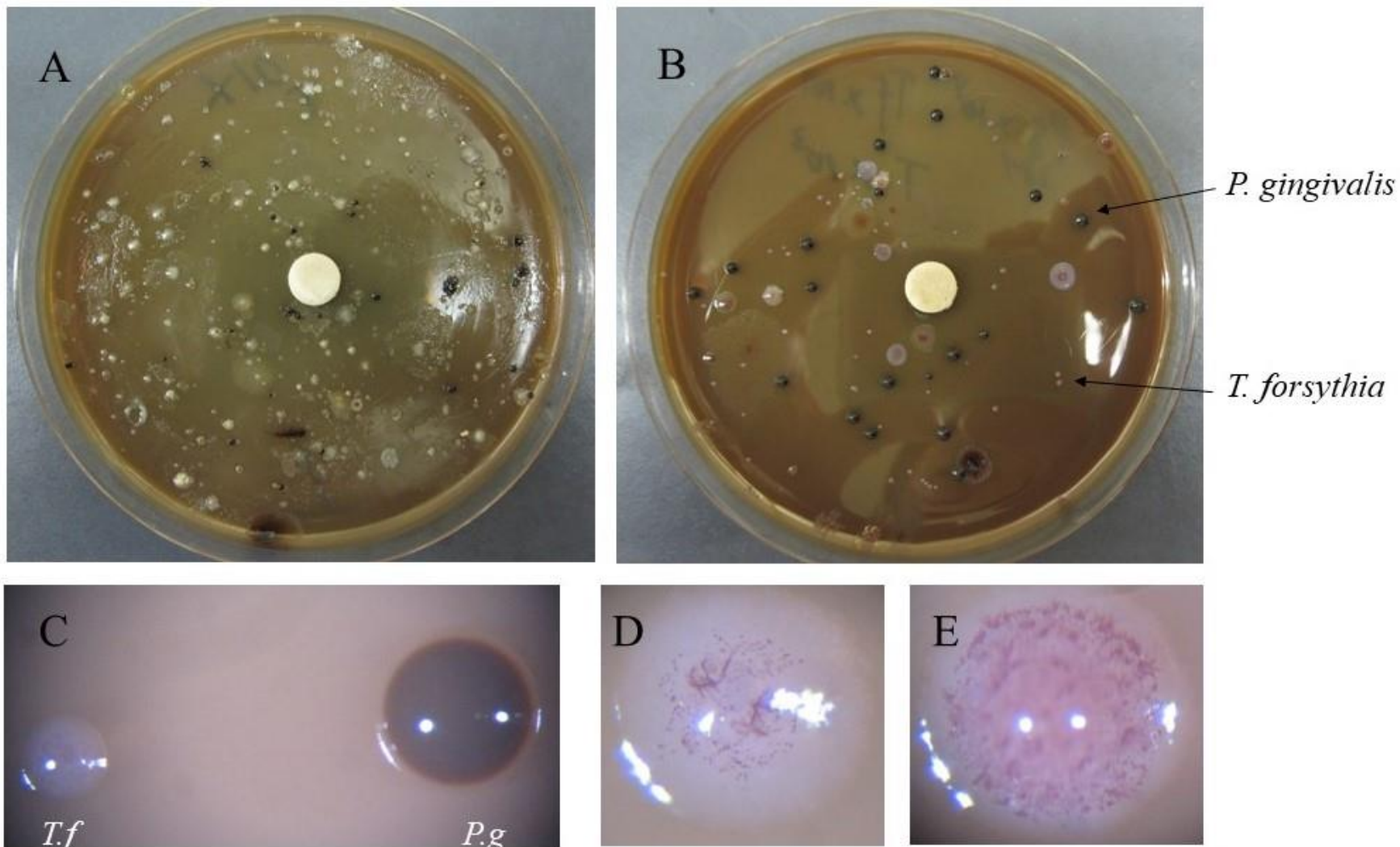


図2 慢性歯周炎患者の GCF 試料を接種・塗抹・培養後に PGTFSM 上に形成した *P. gingivalis* と *T. forsythia* のコロニー像  
 A : CDC 血液寒天培地、B : PGTFSM、C : PGTFSM 上の *P. gingivalis* と *T. forsythia* のコロニー像、  
 D、E : PGTFSM 上の *T. forsythia* コロニーの拡大像