

DNAチップを用いた
歯周病原細菌の検出能の評価

Evaluation of Detectivity of Periodontopathic Bacteria Using DNA Chip

○高山和人, 小田奈津季, 船橋英利, 熊谷知弘
株式会社ジーシー

OBJECTIVES

歯周病に関連する細菌が多数報告されているが、歯周病原細菌が口腔内にいきなり存在することはまれであり、歯周病の発症・進行には、口腔内細菌の存在バランス（細菌叢）が関わっていると考えられる。DNAチップによる細菌検査では多種の細菌を一度に評価できるため、歯周病関連細菌の細菌叢解析が可能になることが期待される。本研究では、標準菌を用いたDNAチップの検出能の評価を目的とした。

MATERIALS and METHODS

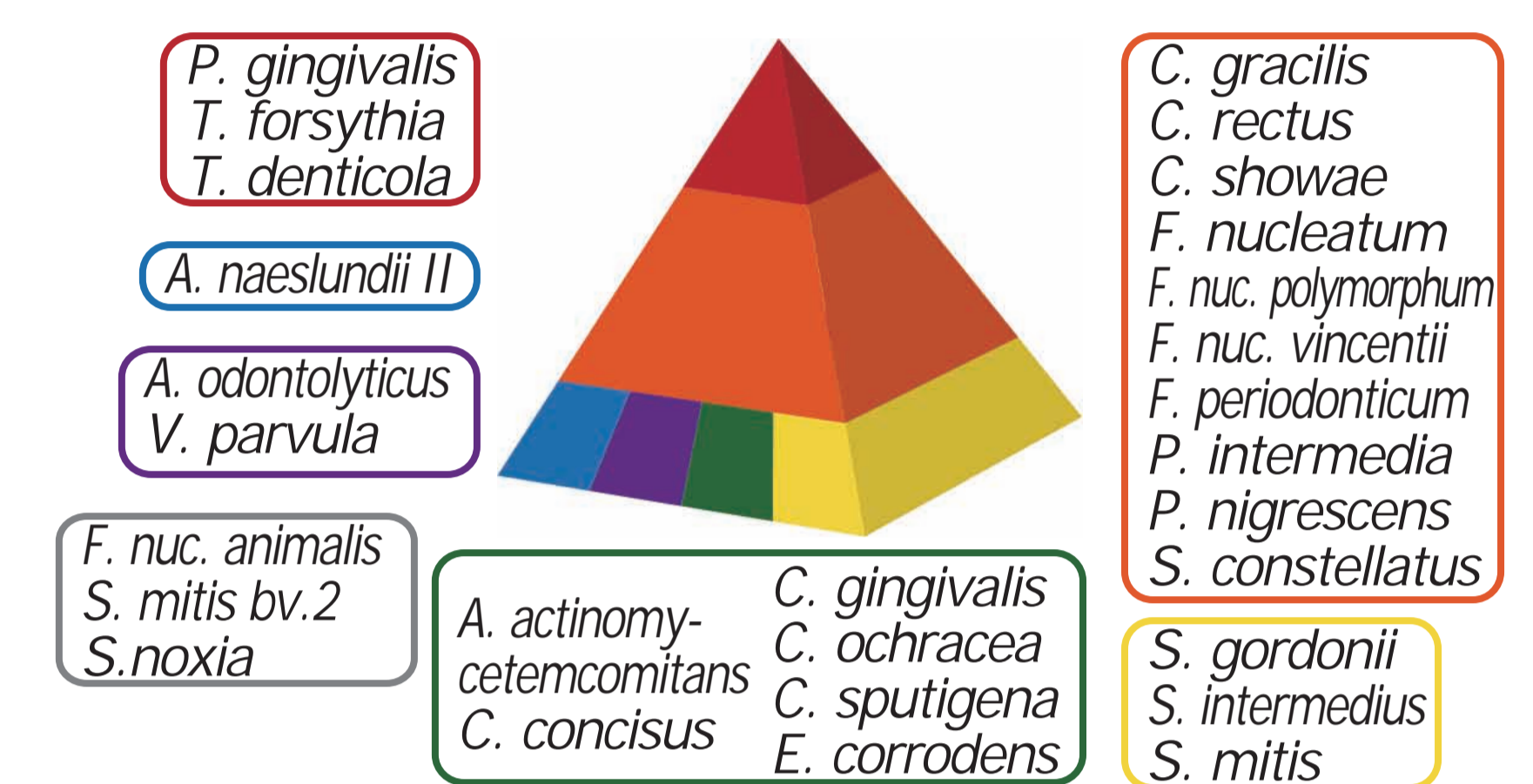
使用菌種

口腔細菌叢DNA検査では歯周病関連細菌28菌種の検査が可能であるが、本研究ではそのうちの代表的な10菌種に関して評価を行った。試験に用いた菌種を以下に示す。

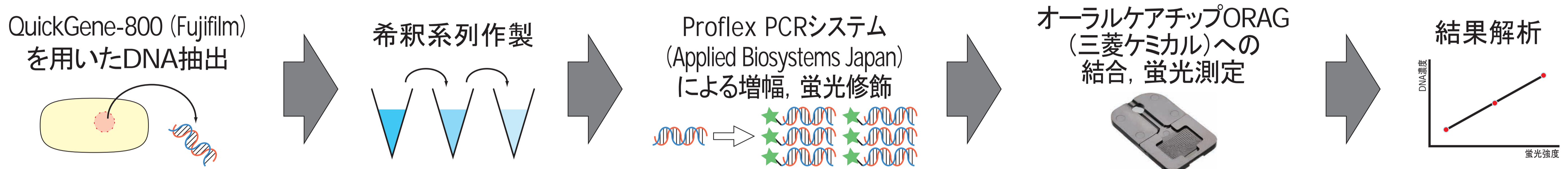
P. gingivalis JCM8525 *F. nucleatum* ssp. *nucleatum* JCM8532 *S. gordonii* JCM12995
T. denticola JCM8152 *C. rectus* JCM6301 *V. parvula* JCM12972
T. forsythia JCM10827 *A. actinomycetemcomitans* JCM2434 *国立研究開発法人
P. intermedia JCM11150 *C. gingivalis* JCM12953 理化学研究所バイオリソースセンターより購入



Fig. 1: Oral Flora DNA Inspection

Fig. 2: Diagram of bacteria associated with periodontal disease
Reference: Socransky SS et al., *Periodontol* 2000, 28: 12-55, 2002

試験方法



臨床検体での評価

被験者2名からガムを用いた刺激唾液を採取した。DNA抽出を行い、DNAチップを用いて細菌叢の評価を行った。この試験は株式会社ジーシーの倫理委員会の承認を得て実施した。

RESULTS and DISCUSSION

得られた検量線の情報

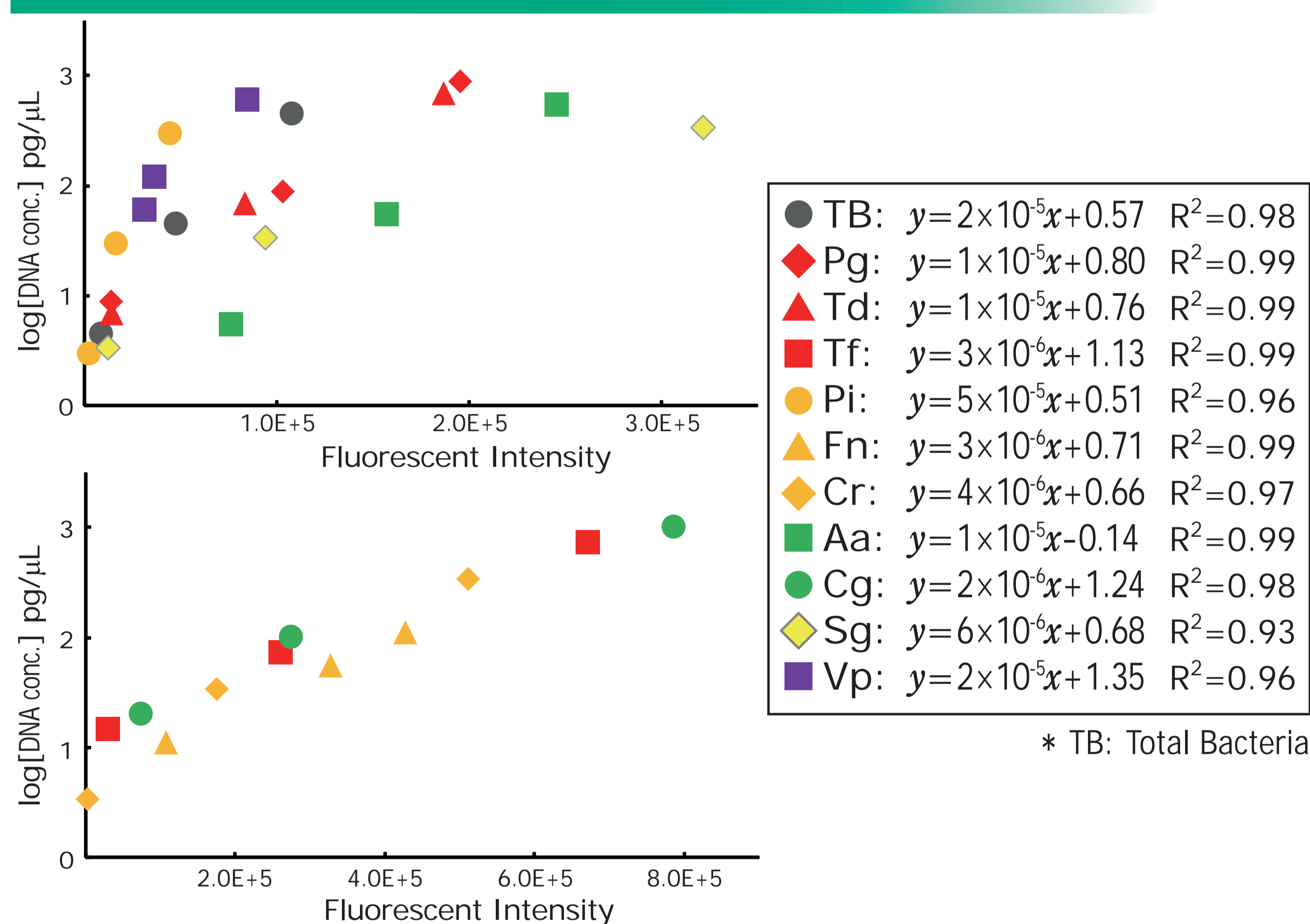


Fig. 3: Correlation of DNA concentration and fluorescent intensity and formulae of standard curves.

臨床検体での評価結果

被験者2名の刺激唾液から抽出したDNAを用いた試験の結果をTable 1に示す。

Table 1: Results of the oral bacteria test of the stimulated saliva using DNA chip

	Fluorescent Intensity	cell/mL		Fluorescent Intensity	cell/mL
①			②		
TB	1.4x10 ⁵	6.3x10 ⁹	TB	6.9x10 ⁴	2.8x10 ⁸
Pg	3.9x10 ²	2.5x10 ⁶	Pg	N.D.	N.D.
Td	N.D.	N.D.	Td	N.D.	N.D.
Tf	N.D.	N.D.	Tf	N.D.	N.D.
Pi	N.D.	N.D.	Pi	N.D.	N.D.
Fn	5.4x10 ⁴	3.1x10 ⁶	Fn	1.4x10 ⁴	2.3x10 ⁶
Cr	4.2x10 ²	1.7x10 ⁶	Cr	2.6x10 ²	1.7x10 ⁶
Aa	N.D.	N.D.	Aa	N.D.	N.D.
Cg	N.D.	N.D.	Cg	3.3x10 ²	6.0x10 ⁶
Sg	2.4x10 ⁴	2.8x10 ⁶	Sg	1.5x10 ⁴	2.4x10 ⁶
Vp	8.2x10 ³	1.4x10 ⁷	Vp	5.9x10 ³	1.2x10 ⁷

* N.D.: Not Detectable

考察

Fig. 3より、各細菌について検量線を作成可能であることが示唆された。細菌種によって蛍光強度に差が見られたが、DNAチップに搭載されている検出用プローブの結合能が影響していると考えられる。各検量線を利用してDNA濃度に換算することで歯周病関連細菌の細菌叢解析が可能になることが期待される。また、臨床検体（刺激唾液）を用いた評価の結果、唾液中に存在する細菌を検出することが可能であることが示唆された。

CONCLUSION

標準菌から抽出したDNAを用いた試験の結果、蛍光強度とDNA濃度の間に直線性が認められた。検量線を利用して刺激唾液中の細菌の定量が可能であり、DNAチップの検出能が確認された。今後は、臨床検体での試験を行い、臨床所見と細菌叢の関連を評価していく予定である。