

DNAアレイによる口腔細菌叢の変動解析

柴田 健一郎 [北海道大学大学院歯学研究科／教授]
市川 由加里 [(株)ラボ 研究受託センター／研究員]
白田 勝利 [(株)ジェネティックラボ／主任研究員]
安田 元昭 [北海道大学大学院歯学研究科／助教授]

背景・目的

口腔は多くの病原菌の進入門戸であるにもかかわらず、多くの病原菌は定着できない。その因は口腔には常在細菌叢が形成されており、そのために病原菌が排除されるためである。さらに、口腔ならびに腸管の常在細菌叢は成長過程での免疫力の発達にも深くかかわっていることも明らかにされている。一方、虫歯や歯周炎などの口腔感染症は歯垢細菌叢を構成しているいくつかの細菌がその発症に深くかかわっていると考えられている。最近、歯垢をバイオフィルムとしてとらえ、口腔感染症は代表的なバイオフィルム感染症であり、虫歯や歯周炎の原因はバイオフィルム細菌叢の変動によるものとする考えが優勢になってしまっている。さらに、口腔細菌叢は口腔感染症だけでなく、動脈硬化、誤嚥性肺炎などの全身性の疾患の原因にもなっていることが明らかにされている。そこで、本研究では、種々の細菌に特異的なDNAをメンブレンにスポットしたDNAアレイを作製し、口腔細菌叢の変動を迅速に解析する方法を確立することを目的とする。

以上が申請当時の研究背景・目的であったが、昨年末にヨーロッパの企業(lamda社)が同様な目的のDNAチップを製品化したことが判明した。そこで、このままでは彼らの模倣になってしまないので、誤嚥性肺炎の起因菌に注目したDNAアレイシステムを確立することに変更した。

内容・方法

- 1) 代表的な口腔細菌ならびに口腔から検出される病原細菌についてアライメント検索を行い、その細菌を特徴付けるDNA配列を決定した。この際、一つの菌種でいくつかの特異的な遺伝子を選択した。
- 2) 各口腔細菌に特異的な遺伝子配列をプラスミド(pGEM)に組み込み、ナイロンメンブレンにスポットするためのDNA断片を大量に合成した。
- 3) 合成したDNA断片を精製後、ナイロンメンブレン上にスポットテイングすることで口腔細菌検出用DNAアレイ・プロトタイプを作製した。
- 4) 検出対象の各口腔細菌に対応する検出プローブ用PCRプライマーを最適設計し、全細菌種のPCRプライマーを混合した1チューブPCRにおいて目的細菌プローブの特異的な検出が可能かどうかを検証することで、細菌検出に最適なPCRプライマーセットを構築した。
- 5) 設計したプライマーと口腔細菌検出用DNAアレイ・プロトタイ

プを用いて、実サンプルでの検証を繰り返すことで、最良な検出用遺伝子配列並びにプローブ用PCRプライマーの見直しを重ね、最終的に、口腔内の唾液、歯垢ならびに喀痰を検体とした検査に対応可能なシステムの確立を目指した。

結果・成果

本研究では、加齢に伴い深刻な誤嚥性肺炎を引き起こす可能性が示唆されている肺炎関連病細菌に注目した、肺炎関連病細菌検出用DNAアレイ・プロトタイプ構築のために、21種の細菌を選択し、クローニングを進めた。

各細菌を特徴付ける遺伝子として、一般に利用されることの多いリボゾームRNA遺伝子に対するプライマーをそれぞれ設計し、更に、構造蛋白質や代謝酵素などの特異的な蛋白質についても検討を加えた。アライメント検索の結果、リボゾームRNA遺伝子は各々の細菌間で相同意識が高く、プライマー領域は異なった配列の設計に成功したもの、検出用のプローブは互いに交差することが予想された。このため、全てのプライマーを混合して、1チューブPCRを行い、リボゾームRNA遺伝子が特異的に検出されるか検証を行った。この結果、全ての細菌において、交差を表す複数の陽性シグナルが現れ、プライマー配列を見直してみたものの、一般的に汎用されているリボゾームRNA遺伝子配列では、今回の対象の細菌に対しては、結果的に交差は避けられないと結論づけた。このため、特異的蛋白質を1つの細菌について可能な限り複数搭載する方向でクローニングを進めるのが、特異的な検出には最良の選択と判断した。

各々の細菌に特異的な蛋白質の遺伝子を検索し、検出用の遺伝子の配列を単独で検出されることを確認してから、全ての遺伝子に対するプライマーを混合した1チューブPCRを行い、交差の認められた配列は見直すことを繰り返し、安定な検出システムとした。

本研究は、歯学ならびに医学分野で特に感染症の予防ならびに診断につながることが期待され、その観点から、病原性の細菌に対する遺伝子を可能な限り搭載する必要があると考え、特に深刻な感染として、肺炎の原因になる細菌の遺伝子のクローニングを進めた。その結果、*Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma penetrans*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*など、9種類の口腔から検出される病原細菌を特異的に検出するプライマーとプローブの組み合わせを見出した。

完成した肺炎関連細菌検出用DNAアレイ・プロトタイプを用いて、標準の細菌標本の検出を行った結果、特異的なシグナルを検出することが可能であり、検体からの細菌の検出に実用可能なレベルであると判断された。

今後の展望

- 1.これまでに検索していない細菌の特異的遺伝子を検索し、肺炎関連細菌検出用DNAマイクロアレイを作成する。
- 2.1.で作成したDNAマイクロアレイを用いて、肺炎患者の喀痰のサンプルからどのような細菌が検出されるかを検討する。