

83. 歯周病菌の遺伝子型による新規早産リスク評価法の構築

有馬 弘晃

長崎大学 熱帯医学研究所 国際保健学分野

Key words : 歯周病原細菌, 妊婦, *RgpA*, サンガーシーケンス, リスク評価

緒言

人類の約 50%が罹患しているとされる歯周病は、多くの合併症（糖尿病や認知症など）をもたらすことが明らかになってきた [1]。妊婦が歯周病に罹患していると、歯周病菌が子宮内の炎症性サイトカイン濃度を上昇させ、早産や低体重児出生を誘発する危険性が高まることが分かっている [2]。特に、医療資源が乏しく産後の処置が十分とは言えない途上国では、早産や低体重児出生が新生児の命を脅かしている [3]。しかし逆に言えばそれは、妊婦の歯周病を予防することができれば、早産や低体重児出生のリスクを大幅に軽減できることを意味する。

歯周病ケアを基盤とした早産・低体重児出生の予防策を講じるためには、歯周病と妊娠を取り巻く実態を明らかにする必要がある。これまで報告されてきた研究では、歯周ポケットの深さや出血指数などの指標を用いて歯周病の“進行度”を評価することが主流であった。しかし、妊婦の歯周病罹患やその重症度が早産や低体重児出生の発生と有意に関連していない研究結果が散見されることも報告されている [4]。そこで、早産・低体重児出生予防を目的とした口腔ケアの効果的な介入方法を見出すためには、異なる視点から歯周病と妊娠異常との関連性を探る必要がある。我々はこれまで、歯周病の原因であり同時に妊娠異常を誘発する根源でもある“歯周病菌”に着目し、妊婦口腔内の歯周病菌量が出産時の妊娠週数や出生児体重にもたらす量的影響の分析に取り組んできた [5, 6]。しかしながら、歯周病菌の病原遺伝子の遺伝子型が妊娠結果にもたらす質的影響はこれまで評価されてこなかった。

本研究では歯周病菌の病原遺伝子に着目し、その塩基配列から遺伝子型分類を行う。重度歯周病との関連が深い歯周病菌 4 種それぞれにおいて、どの遺伝子型がより早産や低体重児出生を誘発するリスクが高いのか明らかにし、歯周病菌の『高リスク型』を探索することを目的とした。

方法

1. ApE（プライマー設計ソフト）を用いたプライマーの設計

本研究では *P. gingivalis* の病原性遺伝子である *RgpA*、*RgpB*、*Kgp* の全塩基配列データを取得し、早産や低体重児出生に対する高リスク型遺伝子もしくは高リスク型株を探索することを試みた。将来、周産期医療に関して多くの課題を抱える途上国でも実装可能な検査法を開発することも目的としているため、サンガーシーケンスによる塩基配列の取得を試みた。そこで、まず各病原性遺伝子を 1,000 bp で区切り、ApE でプライマー候補をリストアップした。フォワードプライマーとリバースプライマーの T_m 値が同じ若しくは近いプライマー同士を採用した。また、各プライマーセットによる増幅領域は、両末端が次のプライマーセットによる増幅領域と重なるように設計し、サンガーシーケンスによる末端部の解読不能な領域に考慮した。

2. PCR の実施

RgpA の 6 プライマーセット、*RgpB* の 3 プライマーセット、*Kgp* の 6 プライマーセットそれぞれにおいて、プライマーの T_m 値を考慮した反応条件で PCR を行った。PCR 反応液は全量で 20 μ l とし、PCRMix として

2×kapa2G Fast ReadyMix dye を 10 μ l、25 μ M のフォワードプライマーとリバースプライマーをそれぞれ 1 μ l (最終濃度 : 500 nM)、RNase free water を 6 μ l、テンプレート DNA を 2 μ l 加えた。Run 条件は 95°C で 5 分インキュベートした後、95°C で 15 秒、60°C で 15 秒、72°C で 15 秒を 35 サイクル実施し、最後に 4°C で ∞ 設定した。プライマーの Tm 値によってアニーリング温度を 57°C から 60°C で変動させた。

3. 電気泳動によるバンドの確認とゲルの切り出し

1.5%のアガロースゲルを用いて 100 V、30 分で PCR 産物の電気泳動を行った。Positive control である ATCC 株の DNA と同じバンドサイズがあるかを確認した。複数の目的外 PCR 産物が認められた場合は、Positive control である ATCC 株の DNA と同じサイズのバンドをゲルごと切り出し、DNA 抽出キット NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up を用いて精製した。

4. サンガーシーケンスの実施

PCR 産物を用いて 5'末端と 3'末端の双方からシーケンスを行い、塩基配列データを取得した。本助成期間中には上記 PCR 条件の検討とゲルからの切り出し作業に時間を要し、サンガーシーケンスによる配列データを取得する段階まで終了した。

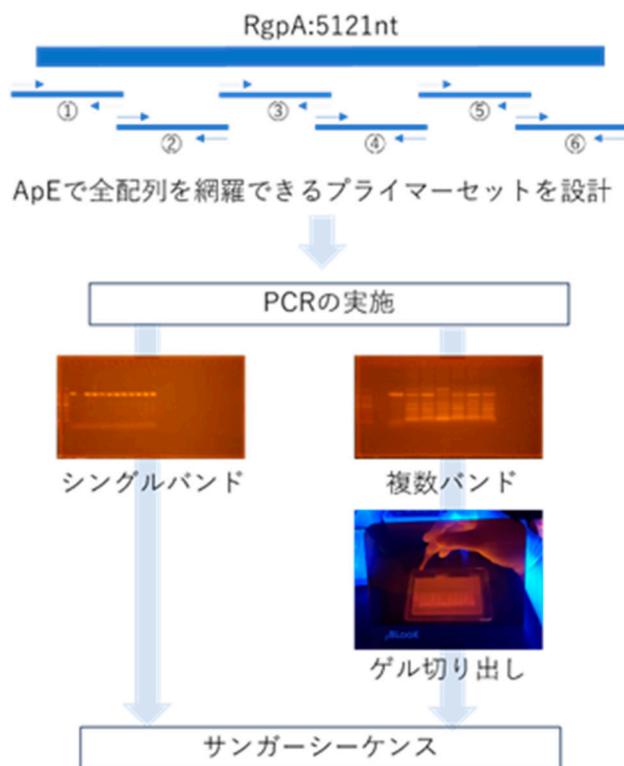


図 1. プライマーの設計と PCR 産物生成及びサンガーシーケンスの流れ

結果

1. プライマーの設計

ApEにより出力したプライマー候補から以下のものを選択し、本研究で用いるプライマーセットとした(表 1)。

表 1. 本研究で設計したプライマーセット

RgpA	Forward (5'末端-3'末端)	Reverse (5'末端-3'末端)
1	GGTAGACGAATGCAAACCAATATG	AGCTGTAACGGGAGAAGCAATATC
2	AGCAGATTGGCGATTACATTC	AACAGTCCATGTGTGCGAGCATCTTC
3	CAAGAACAATCTCGGCCTGACC	TCGAATGTCGTAGCCGTCAG
4	TATAAGCGAAGGTGGTGAAGC	TACTTTACCTTCGTTGCGCCTG
5	AGTAGCCTCTTTCTCATGGAATGG	TCTCCTGCGATCCACATCTTTC
6	TCGTTACAGGACAGGGTGAAG	CGTGACAGGCAGGTATTCTAAC
RgpB	Forward (5'末端-3'末端)	Reverse (5'末端-3'末端)
1	AAGCATAATGGAGCAGCTCTTC	GTCTTCATCGGTCGTTTCTCATGTG
2	GGGATCAAATCCGACCAGG	GGAAGGTACATCTATTGCCGACG
3	TGAGAGTATCGCTGATGAAACG	CATTCCGGCACAGCCCTTT
Kgp	Forward (5'末端-3'末端)	Reverse (5'末端-3'末端)
1	GGCCGTGGTTCTCTGAATC	AGTGTCAACCAACCAAAGCCAAG
2	ACAATGATGGATTGGCAGCTAGTG	TAGTCATATTCACAGTCGCAACACC
3	ATTCAGGCTTCTGCCGTTCTTAC	TAAGCGTACTTTCTGGCCGAC
4	TCTCCGAAGGTATGTAAAGACG	ATCTTGCTCCGCCCTTATTTATTCC
5	ATGATCTCCAAGACGGGCAC	ATCCAATGCTGTCCACCCTG
6	AGAACCTGAAGGCACAACC	TTTAAGGAAGTCGGGCGACC

2. PCR と電気泳動の実施結果

まず Positive control である ATCC33277 株の DNA と Negative control の RNase free water を用いて各プライマーセットによる PCR を実施し、電気泳動で増幅産物を確認したところ、全てのプライマーセットにおいて Positive control でシングルバンドが確認された。また同様に、全てのプライマーセットで Negative control ではバンドが確認されなかった。

そこで、実際の妊婦サンプルを用いて PCR を行ったところ、RgpA のプライマーセット 5 では目的外サイズの PCR 産物が複数確認された。目的のバンドサイズも増幅はされていたが、この PCR 産物をそのままサンガーシーケンスに用いると波形が重なり解析に用いることができないため、切り出したゲルから DNA を精製した。切り出したゲルは 100 mg 前後であったため、キットのプロトコル通りに DNA を抽出した。同様に RgpB のプライマーセット 3 と Kgp のプライマーセット 5 で複数バンドが確認されたため PCR 産物の精製処理を行った (図 2)。

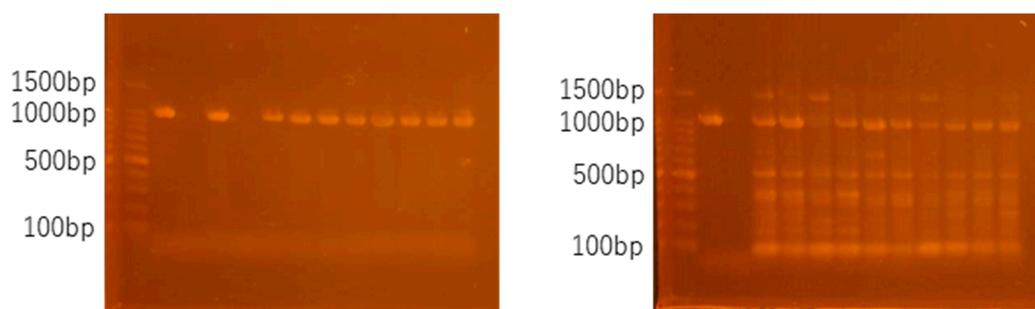


図 2. PCR 産物の電気泳動

左) シングルバンドが得られた PCR 産物。

右) ゲルの切り出し及び精製が必要だった PCR 産物。

3. サンガーシーケンス

上記サンプルを用いたサンガーシーケンスにより、5' と 3' 末端の双方から塩基配列データを取得した。テキストファイルと AB1 ファイルを取得し、MEGA11 に取り込んでアライメントとデータクリーニングを配列領域ごとに実施している。

考 察

本助成期間では *P. gingivalis* の病原性遺伝子の全配列データを取得するためのプライマーを設計し、実際に塩基配列データを取得することに成功した。一方で、プライマーセットによっては目的外の複数バンドが確認され、アガロースゲルからの切り出しと DNA 抽出が必要であり、やや煩雑なプロトコルといえる。早産や低体重出生児が未だ大きな保健課題として残っている途上国においては、より簡便な検査法の導入が求められるため、コンベンショナル PCR でも確実にシングルバンドが得られるプライマーや PCR 条件の検討を今後も継続していく。

これまでに、疾患リスクと病原体遺伝子型との関連では、子宮頸がんを引き起こすヒトパピローマウイルス (HPV) に高リスク型が存在することが明らかになっている [7]。WHO の報告では100か国でHPVワクチンが導入されており、日本でも高リスク型をターゲットとしたワクチン接種が公費で受けられるよう整備されるなど、その臨床的意義の高さが認められている。この例から着想を受け、歯周病菌にも早産・低体重児出生リスクをより高める遺伝子型が存在するのではないかと我々は考え、本研究を遂行している。歯周病菌の何が妊娠異常を引き起こさせるのか、そしてその作用を食い止める術はあるのか、この問いを解決するために今後もデータ解析を続け、高リスク型菌を探索していく。

歯周病菌の変異株 (遺伝子型) がもたらす早産・低体重児出生リスクを評価することができれば、歯周病菌検査による新たな早産・低体重児出生のリスク評価モデルを提示することができる。人類に最も身近な感染症である歯周病を適切に評価・管理することによって、世界で未だ多くの母子が影響を受けている早産・低体重児出生の予防に貢献できる。

共同研究者・謝辞

本研究で用いたサンプルを共同で収集したルワンダ大学の Akintije Simba Calliope 氏に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Negrato CA, Tarzia O, Jovanović L, Chinellato LE. Periodontal disease and diabetes mellitus. *J Appl Oral Sci.* 2013 Jan-Feb;21(1):1-12. doi: 10.1590/1678-7757201302106. PMID: 23559105; PMCID: PMC3881811.
- 2) Fardini Y, Chung P, Dumm R, Joshi N, Han YW. Transmission of diverse oral bacteria to murine placenta: evidence for the oral microbiome as a potential source of intrauterine infection. *Infect Immun.* 2010 Apr;78(4):1789-96. doi: 10.1128/IAI.01395-09. Epub 2010 Feb 1. PMID: 20123706; PMCID: PMC2849412.
- 3) Liu L, Oza S, Hogan D, Chu Y, Perin J, Zhu J, Lawn JE, Cousens S, Mathers C, Black RE. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet.* 2016 Dec 17;388(10063):3027-3035. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31593-8. Epub 2016 Nov 11. Erratum in: *Lancet.* 2017 May 13;389(10082):1884. PMID: 27839855; PMCID: PMC5161777.

- 4) Walia M, Saini N. Relationship between periodontal diseases and preterm birth: Recent epidemiological and biological data. *Int J Appl Basic Med Res.* 2015 Jan-Apr;5(1):2-6. doi: 10.4103/2229-516X.149217. PMID: 25664259; PMCID: PMC4318095.
- 5) Ye C, Xia Z, Tang J, Khemwong T, Kapila Y, Kuraji R, Huang P, Wu Y, Kobayashi H. Unculturable and culturable periodontal-related bacteria are associated with periodontal inflammation during pregnancy and with preterm low birth weight delivery. *Sci Rep.* 2020 Sep 25;10(1):15807. doi: 10.1038/s41598-020-72807-9. PMID: 32978483; PMCID: PMC7519089.
- 6) Arima H, Calliope AS, Fukuda H, Nzaramba T, Mukakarake MG, Wada T, Yorifuji T, Mutesa L, Yamamoto T. Oral cleaning habits and the copy number of periodontal bacteria in pregnant women and its correlation with birth outcomes: an epidemiological study in Mibilizi, Rwanda. *BMC Oral Health.* 2022 Sep 26;22(1):428. doi: 10.1186/s12903-022-02443-4. PMID: 36163018; PMCID: PMC9512986.
- 7) Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003 Feb 6;348(6):518-27. doi: 10.1056/NEJMoa021641. PMID: 12571259.