



DNAチップを用いた 唾液中の歯周病関連細菌叢の評価



Evaluation of Periodontal Disease Associated Bacterial Flora using DNA Chip

○高山和人, 笹部奈津季, 船橋英利, 熊谷知弘
株式会社ジーシー

OBJECTIVES

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。口腔細菌叢DNA検査(ジーシー, Fig. 1)は歯肉溝滲出液を検体として28菌種の歯周病関連細菌(Fig. 2)と総菌数をDNAチップを用いて定量的に検出する。歯肉溝滲出液は局所的な情報を得ることが可能であり、唾液は非侵襲的に口腔内全体の様子を把握できると考えられる。本研究では、健常な被験者から採取した唾液中の細菌叢をDNAチップを用いて評価し、臨床所見との関連を評価することを目的とした。



Fig. 1: Oral Flora DNA Inspection

MATERIALS and METHODS

被験者と検体採取

健常な被験者26名について、6点法で測定したポケット深さ、出血箇所を記録後、無味のガムを用いて刺激唾液を採取した。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。

試験方法

採取した唾液からQuickGene(KURABO)を用いてDNAを抽出し、オーラルケアチップORAG(DNAチップ, 三菱ケミカル)を用いて細菌叢(歯周病関連細菌28菌種および総菌数)の評価を行った。また、リアルタイムPCR法を用いて総菌数を測定した。

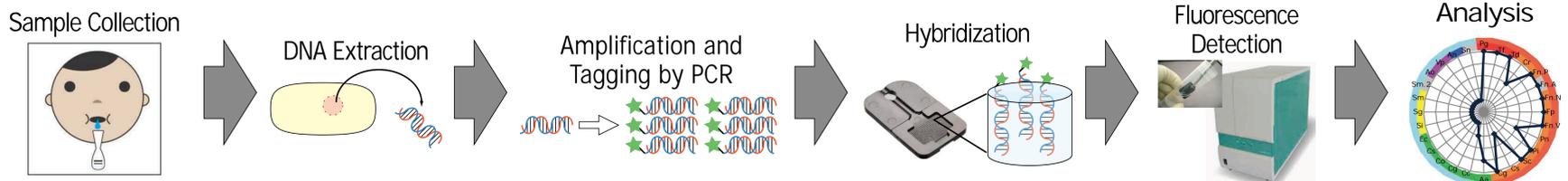


Fig. 3: Test methods of DNA chip

解析方法

DNAチップ、リアルタイムPCRで得られた総菌数の結果を比較し、Spearmanの順位相関係数 ρ を算出した。細菌叢についてクラスター解析を行い、3群に分類した。それぞれの群について最大ポケット深さ、出血箇所の平均値を算出し、比較を行った。クラスター解析にはJUSE-StatWorks/V4.0 Version 4.88(日本科学技術研修所)を用いた。

RESULTS and DISCUSSION

総菌数の比較の結果

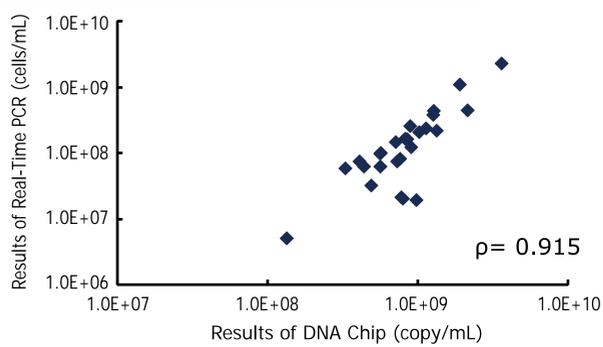


Fig. 4: Correlation of the results of DNA array and those of real-time PCR

クラスター解析の結果

Table 1: Clinical findings of each cluster
() means standard deviation

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Total
Average value of the deepest PPD	3.7 (1.5) mm	5.2 (2.1) mm	5 mm	4.4 (1.9) mm
Average value of bleeding sites	2.2 (3.7)	7.6 (7.3)	3	4.7 (6.1)

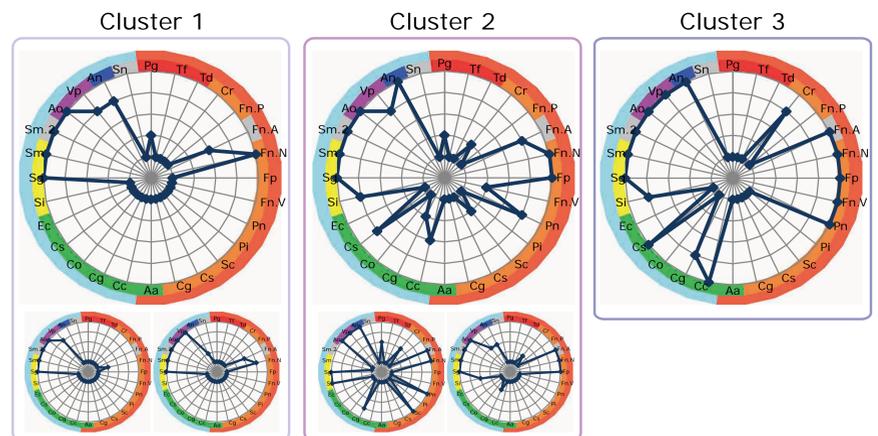


Fig. 6: Radar charts of each cluster
Upper: average of each cluster Lower: typical examples of each cluster

臨床検体での評価結果



Fig. 5: Dendrogram and heat map of the test results
The number of bacteria: Small (Green) Large (Red)

DNAアレイでの総菌数とリアルタイムPCRでの総菌数の間に強い相関が認められた(Fig. 4)。これより、DNAチップの定量性が示唆された。

クラスター解析の結果、細菌叢によって3群に分類された(Fig. 5)。各群の臨床所見を評価した結果、有意差は見られなかったもののOrange complexが増えるにつれてポケットが深くなり、出血箇所が多くなる様子が見られた。健常者であっても、唾液中の細菌叢のバランスによって臨床所見に差が見られることが示唆された。

CONCLUSION

DNAチップを用いた細菌検査は定量性が認められた。Orange complexが増加して細菌叢のバランスが変わることで、最大ポケット深さの値、出血箇所が増加する様子が見られた。これより、健常者であっても唾液中の細菌叢のバランスによって臨床所見に差が見られることが示唆された。