

原 著

リアルタイム定量 PCR による唾液からの口腔レンサ球菌種の検出

猪 俣 恵 引 頭 毅 長谷川 義 明 村 上 幸 孝

Detection of Oral *Streptococcus* Species in Saliva by Quantitative Real-Time PCR

INOMATA MEGUMI, INTO TAKESHI, HASEGAWA YOSHIAKI and MURAKAMI YUKITAKA

口腔には種々のレンサ球菌が常在し、一部の口腔レンサ球菌は齲蝕、亜急性細菌性心内膜炎や誤嚥性肺炎を引き起こすことが知られている。従って、これらの疾患の発症リスクを評価するためには、簡便に採取できる唾液から各種口腔レンサ球菌を正確に検出することが重要な課題となる。本研究では、リアルタイム定量 PCR を利用して唾液中の各種口腔レンサ球菌を定量的に検出することを試みた。15名の被験者から安静時の唾液を採取し、DNA を抽出した後、各種口腔レンサ球菌 (*Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* あるいは *S. mitis*) を特異的に検出する PCR 用プライマーおよび全菌あるいは全口腔レンサ球菌を検出するユニバーサルプライマーを用いてリアルタイム定量 PCR を行った。その結果、被験者15名の値から算出した *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* あるいは *S. mitis* の全口腔レンサ球菌に占める割合は、それぞれ5%未満であった。また、全口腔レンサ球菌に占める割合は、*S. sobrinus* が5種類の口腔レンサ球菌の中で最も少ないことが明らかになった。本研究では、リアルタイム定量 PCR を利用することによって、数種類の口腔レンサ球菌を同時に定量できることを示した。リアルタイム定量 PCR を応用した唾液中の細菌数や割合の検査によって、将来的に、齲蝕や細菌性心内膜炎等の発症リスクを評価することが可能になるかもしれない。

キーワード：リアルタイム定量 PCR, 口腔レンサ球菌, 唾液

*A variety of Streptococcus species exists in the oral cavity. Several oral Streptococcus species induce dental caries, subacute bacterial endocarditis and aspiration pneumonia. Therefore, the quantitative detection of oral Streptococcus species using saliva as specimen, which can be easily obtained, provides useful information to understand the risk of development of these diseases. In this study, we tried to examine the amounts of representative oral Streptococcus species in saliva by quantitative real-time PCR (qPCR). Saliva samples were obtained from 15 healthy subjects. The amounts of total oral bacteria, total oral streptococci and five oral Streptococcus species were measured by qPCR using universal and species-specific primers. The proportion of *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* or *S. mitis* in total oral streptococci was less than 5% (15-subjects' average value), and that of *S. sobrinus* was the lowest in that of five oral Streptococcus species. In this study, we successfully quantitated several Streptococcus species by using qPCR at the same time. Our study suggests that qPCR enables us to evaluate the risk of development of diseases, such as dental caries and subacute bacterial endocarditis.*

Key words: Quantitative real-time PCR, Oral streptococci, Saliva

緒 言

ヒトの口腔では、数百種にのぼる極めて多彩な菌種

から構成される常在細菌叢が形成されており、その中で主体となる菌種はレンサ球菌である。口腔に棲息するレンサ球菌種はかなり多様であり、各レンサ球菌種

の口腔内局所における分布も様々である。例えば、*Streptococcus salivarius* は唾液中や舌背で主に検出されるが、歯面や歯肉溝にはほとんど認めない¹⁻³⁾。一方、*S. sanguinis* や *S. mitis* などは口腔内の至るところに広く分布していると考えられている¹⁻⁴⁾。ところが、レンサ球菌数やレンサ球菌の全口腔細菌に対する割合、レンサ球菌種の分布などに関する知見の多くは、培養法によって得られたデータに基づいて1970年代から1990年代に報告された論文が元になっており¹⁻⁴⁾、現在まで常識的に用いられてきてはいるが、その信頼性についてはそれ以降殆んど検証されていないのが現状である。

口腔常在レンサ球菌の中には、ヒトに病原性を示すものも含まれている。例えば、ミュータンスレンサ球菌 (*S. mutans* ならびに *S. sobrinus*) は、高いバイオフィルム形成能や耐酸性を有し、齲蝕の主要な原因となる代表的な病原口腔レンサ球菌である^{2, 5)}。また *S. mutans*, *S. sanguinis* や *S. mitis* は細菌性心内膜炎との関連性が報告されている^{6, 7)}。誤嚥性肺炎の発症にもいくつかの口腔レンサ球菌の関与が指摘されている⁸⁾。これらの病原口腔レンサ球菌による疾患の発症リスクを個人レベルで評価しようとする場合、まずその個人から何らかの口腔検体を採取して検査を行う必要がある。検体採取の負担を少なくする意味では、唾液を検体とするのが最も望ましい方法であると思われる。次に、採取した検体からレンサ球菌種の有無を調べるのみでなく、菌数がある程度正確に定量化し、正常な菌数レベルと比較するという客観的評価の実施が必要である。従来は口腔レンサ球菌数の計測には培養法が用いられてきたが、検体の輸送や保管に注意を要す

ること、コロニー形態の観察によって菌種を同定する必要があるため同定が極めて困難なこと、培養困難なレンサ球菌は正確に計測できないこと、あるいは測定に時間がかかることなど多くの欠点が存在する。また、得られた結果の信頼性も検証しにくいという点では、正確な計測に培養法を用いるのは適切ではないと考えられる。

従来の培養法に代わり、近年唾液中の総細菌数の測定などに用いられているのがリアルタイム定量PCR (qPCR) である⁹⁻¹²⁾。この方法では、検体の輸送や保管に特別な配慮は不要であること、DNA塩基配列に基づいて特異的に菌種を検出できること、培養困難なレンサ球菌でも正確に計測できること、また比較的簡便に短時間で正確な測定ができることなど、培養法の欠点を克服することが可能である⁹⁻¹²⁾。そこで本研究では、qPCRを利用して、被験者から採取した唾液中に存在する各種口腔レンサ球菌を検出することを目的とした。

対象および方法

1. 被験者

本研究への協力に同意した学生15名(年齢19~31歳)を被験者とした。なお本研究は、朝日大学歯学部倫理委員会の承認(承認番号第23134号)を受けて実施した。

2. 唾液からのDNAの抽出

被験者から安静時の唾液を2ml採取した後、その一部(200 μl)をマイクロチューブに移し4℃にて12,000 rpmで5分間遠心した。口腔細菌を含む沈殿

表1. 本研究で使用したプライマー

プライマー名	配列	増幅産物の大きさ(bp)	標的遺伝子	参考文献
<i>S. mutans</i> -F	5' GCCTACAGCTCAGAGATGCTATTCT 3'	114	<i>gtfB</i>	(13)
<i>S. mutans</i> -R	5' GCCATACACCACTCATGAATTGA 3'			
<i>S. sobrinus</i> -F	5' TTCAAAGCCAAGACCAAGCTAGT 3'	88	<i>gtfT</i>	(13)
<i>S. sobrinus</i> -R	5' CCAGCCTGAGATTCAGCTTGT 3'			
<i>S. salivarius</i> -F	5' CACGCCATGCTGGAAGTG 3'	67	<i>tnpA</i>	(14)
<i>S. salivarius</i> -R	5' GCGATGAGCCAAGCTGAAG 3'			
<i>S. sanguinis</i> -F	5' CAAAATTGTTGCAAATCCAAAGG 3'	75	<i>gtfP</i>	(14)
<i>S. sanguinis</i> -R	5' GCTATCGCTCCCTGCTTTGA 3'			
<i>S. mitis</i> -F	5' GAGTCCTGCATCAGCCAAGAG 3'	96	The gene encoding putative Glycine-rich protein	(13)
<i>S. mitis</i> -R	5' GGATCCACCTTTTCTGCTTGAC 3'			
全口腔レンサ球菌-F	5' TCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTA 3'	137	16S rRNA	(15)
全口腔レンサ球菌-R	5' GGACAACGCTCGGGACCTAC 3'			
全菌-F	5' CGCTAGTAATCGTGGATCAGAATG 3'	69	16S rRNA	(13)
全菌-R	5' TGTGACGGGCGGTGTGTA 3'			

bp; base pair, *gtf*, glycosyltransferase; *tnp*, transposase

をダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4) で洗浄した後, InstaGene マトリックス (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて DNA を抽出し, 濃度を測定した.

3. qPCR による唾液中の各種口腔細菌の定量的な検出

各種口腔レンサ球菌, 全口腔レンサ球菌および全菌を検出する PCR 用プライマーは, 現在までに報告されている塩基配列を参考にして作製した¹³⁻¹⁵⁾ (表 1). プライマーの特異性は, *S. mutans* OMZ175, *S. sobrinus* OMZ176, *S. salivarius* ATCC 25975, *S. sanguinis* 5224あるいは *S. mitis* 903の菌液から抽出した DNA を鋳型 DNA として, 従来型 PCR を行い確認した. プライマーによる PCR 増幅効率は, $10^2 \sim 10^9$ CFU/ml に調製した各種口腔レンサ球菌由来の DNA を用いて qPCR を行い, ほぼ 100% であることを確認した. 従来型 PCR 反応は, 94°C, 5 分の初期変性の後, 94°C, 30 秒の熱変性, 54°C, 30 秒のアニーリングおよび 70°C, 1 分の伸長反応からなる 3 ステップをサーマルサイクラー TP650 (タカラバイオ, 大津) を用いて 30 サイクル行った.

qPCR は, プライマーと蛍光物質 SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ) を含む反応液に, 抽出した DNA (~100 ng) を加え, サーマルサイクラー TP800 (タカラバイオ) を用いて行った. qPCR 反応は, 95°C, 10 秒の初期変性の後, 95°C, 5 秒の熱変性ならびに 60°C, 30 秒のアニーリング/伸長反応からなる 2 ステップを 40 サイクル行った. 増幅中の蛍光シグナルは伸長反応時に検出し, 増幅産物の特異性は, qPCR 後の融解曲線分析によって確認した. 菌数は, 検量線を用いた定量法によって算出した. 検量線は, $10^2 \sim 10^9$ CFU/ml に調製した *S. mutans* OMZ175 の菌液から抽出した DNA を標準物質として qPCR を行った後, 増幅が指数関数的に起こる領域で一定の増幅産物量になるサイクル数 (Cycle threshold: Ct 値) を横軸に, 菌数を縦軸にプロットし作成した. 唾液から抽出した DNA 試料についても標準物質と同じ条件下で反応させ, Ct 値を算出した. なお, 各種口腔レンサ球菌由来の DNA を用いて検量線を作成した場合にも, 算出される菌数に違いがないことを確認した. 全菌に対する全口腔レンサ球菌の割合 ($P1$) あるいは全口腔レンサ球菌に対する各種口腔レンサ球菌の割合 ($P2$) は, 鈴木らの方法¹³⁾ を参考にして, それぞれ以下の式より算出した. $P1 = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{\text{全口腔レンサ球菌}} - Ct_{\text{全菌}})} \times 100$ (%). $P2 = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{\text{各種口腔レンサ球菌}} - Ct_{\text{全口腔レンサ球菌}})} \times 100$ (%). 被験者 15 名の結果はグラフにプロットし, 平均値 ± 標準偏差を計算した.

結 果

1. 各種口腔レンサ球菌検出用プライマーの特異性の確認

S. mutans, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* および *S. mitis* のプライマーによる PCR によって, それぞれ目的とする遺伝子の増幅が認められた (図 1). 結果には示していないが, 目的とする菌種以外では各種プライマーによる遺伝子の増幅は認められなかったため, 本研究で使用したプライマーには特異性があることが確認できた.

2. 全菌数および全口腔レンサ球菌数

被験者個人の全菌数ならびに全口腔レンサ球菌数および被験者 15 名の平均値を図 2 に示す. 被験者個人の全菌数は, $1.2 \times 10^7 \sim 7.3 \times 10^{10}$ CFU/ml であり, 被験者 15 名の平均値は, $8.0 \times 10^9 \pm 1.8 \times 10^{10}$ CFU/ml であった. 被験者個人の全口腔レンサ球菌数は, $3.2 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^{10}$ CFU/ml であり, 被験者 15 名の平均値は, $1.8 \times 10^9 \pm 3.2 \times 10^9$ CFU/ml であった.

3. 全菌に対する全口腔レンサ球菌の割合

被験者個人の全菌に対する全口腔レンサ球菌の割合および被験者 15 名の平均値を図 3 に示す. 被験者個人の全菌に対する全口腔レンサ球菌の割合は, 12.9 ~ 67.4% であり, 被験者 15 名の平均値は, 43.2 ± 23.6 % であった.

4. 各種口腔レンサ球菌数

被験者個人の各種口腔レンサ球菌数および被験者 15

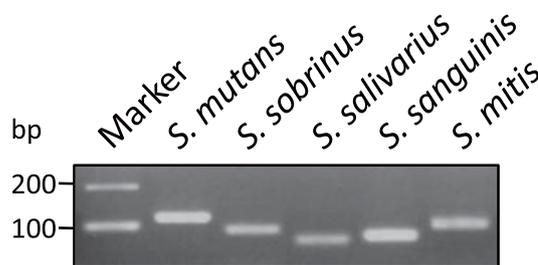


図 1 各種口腔レンサ球菌検出用プライマーの特異性

S. mutans OMZ175, *S. sobrinus* OMZ176, *S. salivarius* ATCC 25975, *S. sanguinis* 5224 あるいは *S. mitis* 903 の菌液から抽出した DNA を鋳型 DNA として, 従来型 PCR を行った. PCR 反応は, 94°C, 5 分の初期変性の後, 94°C, 30 秒の熱変性, 54°C, 30 秒のアニーリングおよび 70°C, 1 分の伸長反応からなる 3 ステップを 30 サイクル行った. PCR 反応後, 2% アガロースゲルにて電気泳動を行った. bp; base pair.

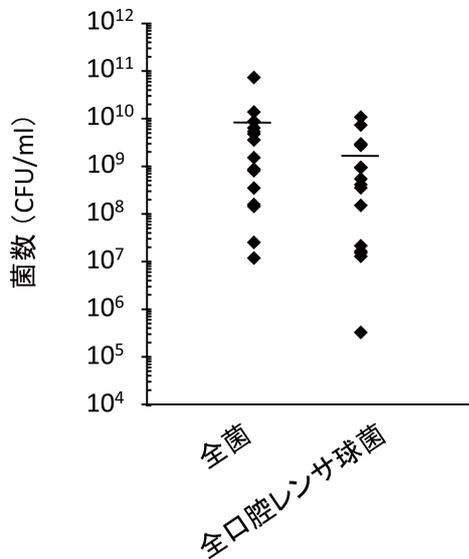


図2 全菌数および全口腔レンサ球菌数

プライマーと蛍光物質 SYBR Premix Ex Taq II を含む反応液に、被験者の唾液から抽出した DNA を加え、サーマルサイクラー TP800 を用いて qPCR を行った。qPCR 反応は、95°C、10 秒の初期変性の後、95°C、5 秒の熱変性ならびに 60°C、30 秒のアニーリング/伸長反応からなる 2 ステップを 40 サイクル行った。菌数は、検量線を用いた定量法によって算出した。黒線は被験者 15 名の平均値を表す。

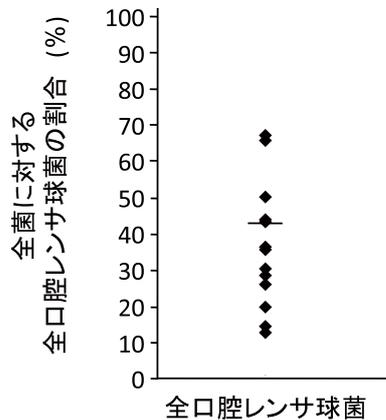


図3 全菌に対する全口腔レンサ球菌の割合

qPCR を行った後、全菌に対する全口腔レンサ球菌の割合 ($P1$) を、以下の式より算出した。 $P1 = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{\text{全口腔レンサ球菌}} - Ct_{\text{全菌}})} \times 100$ (%)。黒線は被験者 15 名の平均値を表す。

名の平均値を図 4 に示す。被験者個人の *S. mutans* 菌数は $3.2 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^7$ CFU/ml であり、被験者 15 名の平均値は $1.7 \times 10^6 \pm 4.0 \times 10^6$ CFU/ml であった。*S. sobrinus* 菌数は、 $3.2 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^5$ CFU/ml、平均値は $3.8 \times 10^4 \pm 4.4 \times 10^4$ CFU/ml であった。*S. salivarius* 菌数は、 $2.4 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^7$ CFU/ml、平均値は

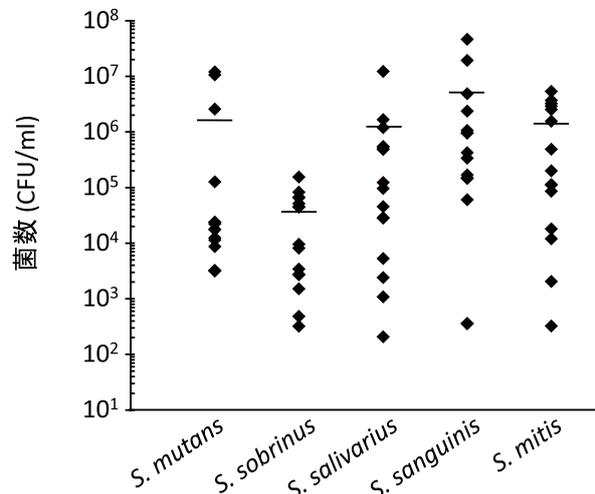


図4 各種口腔レンサ球菌数

qPCR を行った後、検量線を用いた定量法によって菌数を算出した。黒線は被験者 15 名の平均値を表す。

$1.2 \times 10^6 \pm 3.2 \times 10^6$ CFU/ml であった。*S. sanguinis* 菌数は、 $3.6 \times 10^2 \sim 4.6 \times 10^7$ CFU/ml、平均値は $5.1 \times 10^6 \pm 1.2 \times 10^7$ CFU/ml であった。*S. mitis* 菌数は、 $3.2 \times 10^2 \sim 5.3 \times 10^6$ CFU/ml、平均値は $1.4 \times 10^6 \pm 1.8 \times 10^6$ CFU/ml であった。

5. 全口腔レンサ球菌に対する各種口腔レンサ球菌の割合

被験者個人の全口腔レンサ球菌に対する各種口腔レンサ球菌の割合および被験者 15 名の平均値を図 5 に示

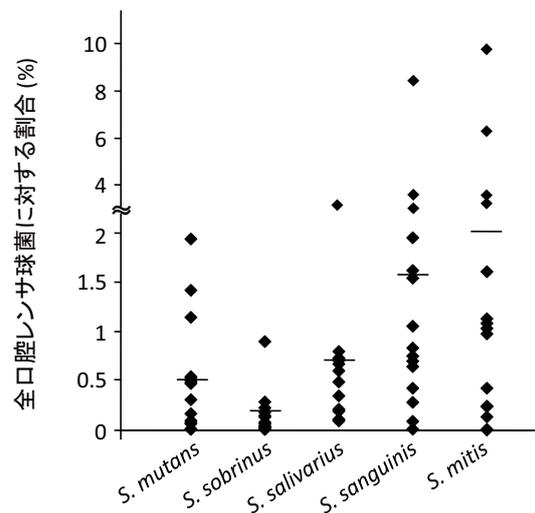


図5 全口腔レンサ球菌に対する各種口腔レンサ球菌の割合

qPCR を行った後、全口腔レンサ球菌に対する各種口腔レンサ球菌の割合 ($P2$) を、以下の式より算出した。 $P2 = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{\text{各種口腔レンサ球菌}} - Ct_{\text{全口腔レンサ球菌}})} \times 100$ (%)。黒線は被験者 15 名の平均値を表す。

す。被験者個人の *S. mutans* の割合は、0.007～2.0%，被験者15名の平均値は $0.5 \pm 0.6\%$ であった。*S. sobrinus* の割合は、0.006～0.9%，平均値は $0.2 \pm 0.2\%$ であった。*S. salivarius* の割合は、0.1～3.3%，平均値は $0.7 \pm 0.8\%$ であった。*S. sanguinis* の割合は0.009～8.4%，平均値は $1.6 \pm 2.1\%$ であった。*S. mitis* の割合は0.001～10.1%，平均値は $2.1 \pm 2.9\%$ であった。

考 察

本研究では、qPCR によって全菌数、全口腔レンサ球菌数および全菌に対する全口腔レンサ球菌の割合を算出することができた。現在までに、培養法によって、唾液中には $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml の細菌が存在することが報告されている^{16,17)}。また、唾液中の口腔レンサ球菌は、全菌のおよそ40%を占めることが報告されている^{1,2)}。そのため、唾液中にはおよそ $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml の口腔レンサ球菌が存在することが考えられる。本研究においても、全菌に占める全口腔レンサ球菌の割合は、およそ40%（被験者15名の平均値）であり、既知の培養法のデータと同じような割合になった。しかし、本研究で得られた全菌数および全口腔レンサ球菌数は、 8.0×10^9 CFU/ml あるいは 1.8×10^9 CFU/ml（被験者15名の平均値）であったため、培養法の知見と比較して多い菌数が得られたことが示唆された。培養法では口腔内に存在する全ての細菌を培養できないこと¹⁸⁾や qPCR では死菌をも検出すること¹⁹⁾が報告されている。ゆえに本研究では、qPCR を用いたことによって培養困難な細菌を検出できたため、菌数が多く算出されたことが考えられた。

本研究では、qPCR によって5種類の口腔レンサ球菌の数および全菌に対する割合も同時に計測することができた。現在までに、各種口腔レンサ球菌の数に関しては十分な知見が得られていないが、各種口腔レンサ球菌の全口腔レンサ球菌に対する割合に関しては、培養法によって幾つかの知見が得られている。*S. salivarius* は、全口腔レンサ球菌に対しおよそ20～60%の割合で存在することが報告されている¹⁻³⁾。この報告を受け、現在では *S. salivarius* が唾液中に最も多く存在するレンサ球菌として認識されている。しかしながら一方で、培養法によって *S. salivarius* の全口腔レンサ球菌に占める割合は、3%であるという報告もある⁴⁾。*S. mutans* に関しては、全口腔レンサ球菌に対しておよそ0～4%存在することが明らかにされている¹⁻⁴⁾。*S. sanguinis* に関しては、全口腔レンサ球菌に対して10～50%の割合で存在する¹⁻³⁾という一方、1%の割合でしか存在しない⁴⁾という報告もある。*S. mitis*

に関しては、10～30%存在することが報告されている²⁾。このように、口腔レンサ球菌の割合は報告によって異なっているものがある。培養法では細菌のコロニー形態を観察することによって菌種を同定する必要があるため、菌種の同定が極めて困難であり、かつ正確さに欠けることが相違が生じる理由として挙げられる。他にも、培養法によって得られたこれらのデータは1970年代から1990年代に報告された論文が元になっているが¹⁻⁴⁾、この20年の間には菌種の分類法が変化し *Streptococcus* 属菌種が増えていることが理由として挙げられる²⁰⁾。実際、*S. sobrinus* は1983年までは *S. mutans* に分類されていた²⁰⁾。

本研究において *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* および *S. mitis* の全口腔レンサ球菌に占める割合は、それぞれ0.5%, 0.2%, 0.7%, 1.6%および2.1%（被験者15名の平均値）であった。今回の結果とこれまでの培養法による数値とを比較すると、*S. salivarius* および *S. mitis* に関しては、割合が少なかった。その理由として、先に述べたように、本研究で実施した qPCR では培養困難な口腔レンサ球菌が検出されたことが考えられた。すなわち、qPCR によって多くの口腔レンサ球菌が検出された結果、*S. salivarius* 等の口腔レンサ球菌の割合が相対的に減少したことが考えられた。

qPCR で全菌および全口腔レンサ球菌を検出する際に用いるユニバーサルプライマーとしては、現在までに種々の異なる塩基配列が用いられている^{9,13,21)}。本研究で利用した全菌および全口腔レンサ球菌を検出するユニバーサルプライマーの塩基配列は、16S rRNA 遺伝子配列内に設計されている。また、これらのプライマーの塩基配列は、今回検出した全ての口腔レンサ球菌の16S rRNA 遺伝子配列内にも存在することを確認している。Lyons らや横山らは、このようなユニバーサルプライマーを使用した場合、唾液中の細菌間においてコピー数に差がないことをすでに検証している^{9,21)}。

qPCR の利点は、細菌の検出・同定を量的にかつ正確に行えることだけでなく、培養困難な細菌の検出が可能なことである。本研究結果から、唾液中には培養困難なために検出・同定されていなかった口腔レンサ球菌種が存在していることが示唆された。このような性状不明な細菌種は、口腔疾患や全身疾患の病因に関与する可能性も考えられる。従って今後の研究では、未知のレンサ球菌種についても qPCR を利用し解析する必要があると考えられた。

従来の培養法による口腔レンサ球菌の検出では、菌の培養に時間がかかること、さらには菌種の同定が困

難であることから、各種口腔レンサ球菌の数や割合は十分に理解されていなかった。本研究では、qPCRを利用することによって、同時に数種類の口腔レンサ球菌を定量することができた。本研究で用いたようなqPCRを応用して唾液中の細菌数や割合を調べることで、将来的に、齲蝕や細菌性心内膜炎等の発症リスクを評価することが可能になるかもしれない。さらには、qPCRを応用し唾液中の未知の口腔レンサ球菌種の検出を試みることで、口腔の細菌叢について理解が広がるかもしれない。

結 論

本研究では、リアルタイム定量PCRを利用することによって、唾液中に存在する5種類の口腔レンサ球菌を同時に定量できることを示した。*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*あるいは*S. mitis*の全口腔レンサ球菌に占める割合は、それぞれ5%未満であった。*S. salivarius*および*S. mitis*の割合は、これまで培養法によって得られている割合に比べ、少ないことが明らかになった。また、5種類の口腔レンサ球菌の中で*S. sobrinus*が最も少ない割合で唾液中に存在することが明らかになった。

文 献

- 1) Socransky SS and Manganiello SD. The oral microbiota of man from birth to senility. *J Periodontol.* 1971 ; 42 : 485-496.
- 2) Hamada S and Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 1980 ; 44 : 331-384.
- 3) Gibbons RJ and Houte JV. Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Annu Rev Microbiol.* 1975 ; 29 : 19-42.
- 4) Marsh PD; Martin M, ed. Oral Microbiology. 5 th ed. Edinburgh: Elsevier ; 2009 : 45-73.
- 5) Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986 ; 50 : 353-380.
- 6) Munro CL and Macrina FL. Sucrose-derived exopolysaccharides of *Streptococcus mutans* V403 contribute to infectivity in endocarditis. *Mol Microbiol.* 1993 ; 8 : 133-142.
- 7) Douglas CW, Heath J, Hampton KK and Preston FE. Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J Med Microbiol.* 1993 ; 39 : 179-182.
- 8) Marrie TJ. Bacteremic community-acquired pneumonia due to viridans group streptococci. *Clin Invest Med.* 1993 ; 16 : 38-44.
- 9) Lyons SR, Griffen AL and Leys EJ. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol.* 2000 ; 38 : 2362-2365.
- 10) Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA and Hunter N. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J Clin Microbiol.* 2002 ; 40 : 1698-1704.
- 11) Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM and Savelkoul PH. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol.* 2003 ; 41 : 4950-4954.
- 12) Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Mart?n C and Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* 2004 ; 31 : 1061-1069.
- 13) Suzuki N, Yoshida A and Nakano Y. Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by TaqMan real-time PCR. *Clin Med Res.* 2005 ; 3 : 176-185
- 14) Seow WK, Lam JH, Tsang AK, Holcombe T and Bird PS. Oral *Streptococcus* species in pre-term and full-term children-a longitudinal study. *Int J Paediatr Dent.* 2009 ; 19 : 406-411.
- 15) 松本 優子. 口腔内連鎖球菌数を測定する方法及びそれに用いるPCRプライマー及びプローブセット. 日本公開特許. 2008-19114.
- 16) Richardson RL and Jones M. A bacteriologic census of human saliva. *J Dent Res.* 1958 ; 37 : 697-709.
- 17) Handelman SL and Mills JR. Enumeration of selected salivary bacterial groups. *J Dent Res.* 1965 ; 44 : 1343-1353.
- 18) Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol.* 2005 ; 32 Suppl 6 : 7-15.
- 19) Josephson KL, Gerba CP and Pepper IL. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 1993 ; 59 : 3513-3515.
- 20) 河村 好章. 医学的に重要な細菌についての分類学1ブドウ球菌とレンサ球菌の分類・この10年の変遷. モダンメディア. 2005 ; 51 : 313-327.
- 21) 横山正明, 福井誠, 増田かなめ, 高松夏子, 岡田寿朗, 武部裕光, 片岡宏介, 伊藤博夫. リアルタイム定量PCR (qPCR) 法による唾液中の総細菌数の測定—口腔清潔度の指標としての試み—. 口腔衛生会誌. 2009 ; 59 : 183-189.