

氏名	橋 本 武
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第 1855号
学位授与の日付	平成11年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	齶蝕細菌叢の分析への分子系統学的手法の応用
論文審査委員	教授 村山洋二 教授 渡邊達夫 教授 福井一博

学位論文内容の要旨

【緒言】

近年、細菌分類学の領域では、特定の遺伝子配列の変異の程度をもとにした系統学的観念を導入した分類が行われるようになった。このような新たな分類学の体系では、小サブユニットのリボソーム RNA(真正細菌と古細菌では 16S rRNA)を”分子時計”として扱い、分子進化学的に細菌種が位置づけられている。すでに広範な細菌種の 16S rRNA 遺伝子(16S rDNA)の塩基配列が解析されデータベース化されており、未同定菌株の 16S rDNA の塩基配列を決定すれば、そのホモロジー検索から属レベルでの同定が可能となっている。さらに新たな方法として、試料を培養して細菌を分離する操作を行わずに、直接、試料中の DNA を抽出し、その中に含まれる 16S rDNA を解析する方法(非培養法)が開発されている。そこで本研究では、齶蝕細菌叢について試料から直接抽出した DNA の 16S rDNA の塩基配列を用いて細菌の系統学的分類、同定を試み、この非培養法の有用性について検討した。

【材料および方法】

1. 齶蝕象牙質試料の採取

26才女性の左下第2大臼歯頬側面齶蝕(試料1)、左上顎中切歯近心面齶蝕(試料2)および56才女性の右下顎側切歯遠心面齶蝕(試料3)より齶蝕象牙質を採取した。試料1, 2は浅在性齶蝕であり、試料3は深在性齶蝕であった。これらの細菌叢を以下の非培養法を用いて解析し、試料1は比較のため培養法によっても解析を行った。

2. 非培養法による細菌叢の解析

試料から Boomらの方法により細菌の DNA を抽出し、PCRにより2つのユニバーサルプライマーを用いて 16S rDNA を増幅した。PCR-Script Amp Cloning Kitを用いて PCR産物を大腸菌にクローニングし、形質転換した大腸菌から試料中に存在する細菌の 16S rDNA を含むプラスミドを抽出した。これらのプラスミドより齶蝕試料中に存在する細菌の 16S rDNA 塩基配列を自動シーケンサーで解析し、塩基配列により分類を行い、Ribosomal Database Project (RDP) のデータベースから 16S rRNA の塩基配列が類似した細菌の検索を行ない、同定を行った。

3. 培養法による細菌叢の解析

試料1の懸濁液を段階希釈し、血液寒天培地に播種し、嫌気条件下で 37°C 1週間培養した。再分離したコロニーから、Boomらの方法により DNA を抽出し、PCRにより 16S rDNA を増幅した。PCR産物の塩基配列

を自動シーケンサーで解析し、塩基配列により分類を行い、RDP での検索により細菌の同定を行った。

【結果】

非培養法による齧蝕細菌叢の分析

試料1~3からそれぞれ48, 27, 28クローンを回収して16S rDNAの塩基配列を決定した。16S rDNAの相同性が98.7%以上のものを1つのphylotypeとして分類すると、それぞれ20, 12, 8のphylotype群に分類された。試料1のphylotype群はHigh G+C Gram-Positive Bacteria, Low G+C Gram-Positive Bacteria, Purple Bacteria および Fusobacteria に属しており、試料2でも同様な系統グループのphylotypeの存在が示されたが、一致したphylotypeは2つのみであった。また試料3のすべてのphylotypeはLow G+C Gram-Positive Bacteriaに属していた。各phylotypeとも近縁な細菌種を検索したところ、9 phylotypeが既知菌種 (*Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Actinomyces georgiae*, *Veillonella atypica*, *Lactobacillus acidophilus* および *Lactobacillus gasseri*) として同定されたが、残りの29 phylotypeは類縁な既知菌種がデータベースに登録されていないかった。

培養法による細菌叢の解析

試料1から培養法により得られた分離菌株の16S rDNAは17 phylotypeに分類され、High G+C Gram-Positive Bacteria, Low G+C Gram-Positive Bacteria, Purple Bacteriaに属しており、これらには非培養法で検出されたphylotypeが2つ含まれていた。各phylotypeと近縁な細菌種を検索したところ6 phylotypeが既知菌種として同定された。

【考察】

非培養法により3試料から得られたphylotypeを比較すると、齧蝕の進行程度の異なる試料3と他の試料では系統グループに差がみられたが、同一被験者で齧蝕の進行が同程度であった試料1, 2での系統グループには大きな差はみられなかった。しかしこれらの試料間でも一致したphylotypeは非常に少なく、各試料間にphylotypeによる差が認められており、非培養法が細菌叢解析において比較的鋭敏な分析法であると考えられる。また既知菌種と相同性が低いphylotypeが、29 phylotype検出された。これらはこれまで分離・同定のなされていない未知の細菌と考えられ、非培養法は従来分離・同定されていない細菌の検出が可能であることが示された。また培養法と比較すると、試料1から非培養法で分類された20 phylotypeは培養法で分類された17のphylotypeに比べ系統的に広範囲に位置していることから、培養法による分離に比べより多様性に富んだ細菌の検出が可能であることを示している。

【結論】

本研究で用いた非培養法による齧蝕細菌叢の解析で、従来報告のない未知の細菌菌種が検出されたことから、非培養法は従来の培養法に比べより多様性に富んだ細菌の分類、同定が可能であり、齧蝕細菌叢の解析を行う方法として非常に優れていると考えられる。

論文審査結果の要旨

新たな細菌分類学の体系ではリボゾーム RNA の塩基配列により細菌種が分子進化的に位置づけられ、また広範な細菌種の 16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) の塩基配列のデータが蓄積されている。このデータベースとの比較により未同定菌株の 16SrDNA の塩基配列から菌種を同定することが可能となっている。

申請論文は、細菌を培養することなく齶蝕病巣から直接、細菌の DNA を抽出し、PCR 法により 16S rDNA を増幅した後、その塩基配列を決定して分子系統学的分類に基づいた齶蝕細菌叢の分析を試みている (非培養法)。その有用性を調べるために、培養法と非培養法での細菌叢の分析結果を比較し、さらに非培養法で 3 つの齶蝕病巣の細菌叢を分析している。その結果、以下のことを明らかとした。

- ① 齶蝕細菌叢を構成する細菌の分離・同定に非培養法を用いることにより、細菌叢を構成する多様な細菌の 16S rDNA が回収され、この塩基配列に基づいた細菌の分子系統学的分類が可能であった。
- ② 非培養法により回収された齶蝕 3 試料に存在する細菌の 16S rDNA において、その塩基配列が互いに 98.7% 以上の相同性を示すものを 1 つの phelotype として分類したところ、3 試料の齶蝕細菌叢の相違を示すことが可能であった。
- ③ 齶蝕試料に存在する細菌を非培養法および培養法のそれぞれの方法で同定したところ、培養法では 6 菌属の細菌が同定され、非培養法では 11 菌属の細菌が同定された。このことから非培養法は培養法に比べより多様な細菌の分離・同定が可能であった。
- ④ 非培養法により齶蝕病巣から得られた細菌の 16SrDNA にはデータベースに登録された既知菌株と相同性の低いものが含まれており、非培養法により分離報告のない未知の細菌の検出が可能であった。

以上の内容は、申請論文で用いている非培養法が齶蝕細菌叢の分析を行う方法として有用であることを示している。本論文は齶蝕細菌叢をより明確に把握することを可能とする研究として評価できる。

よって本申請論文は博士 (歯学) の学位論文として価値あるものと認める。