

氏名 藤 本 千 代

授与した学位 博士
専攻分野の名称 歯学

学位授与の番号 博 乙 第 4 0 2 5 号

学位授与の日付 平成 1 7 年 3 月 2 5 日

学位授与の要件 博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)

学位論文題名 分子生物学的手法による歯周病細菌検査の臨床応用

論文審査委員 教授 北山 滋雄 教授 滝川 正春 教授 高柴 正悟

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

歯周病は複数の細菌感染によって起こる炎症性疾患である。歯周病の病態解明には、歯周ポケット内細菌叢の解析が必要である。また、臨床の場合においては、診断、治療の評価、化学療法タイミングと効果判定、あるいは歯周病活動期の予測のために、この解析は重要である。そして、この解析のためには、嫌気性菌の多い歯肉プラーク中の細菌種を正確かつ迅速に同定し、さらに定量することのできるという、信頼性の高い臨床検査法が要求される。

近年、分子生物学的な手法を応用して、細菌検査法確立のための基礎的研究が広く行われるようになった。現在では、細菌の系統学的分類の指標として重要視されている 16S ribosomal RNA 遺伝子 (16SrDNA) を試験管内で増幅させるポリメラーゼ鎖反応 (PCR) 法が、細菌検査の主流となりつつある。PCR 法は高感度で特異性の高い方法であるが、定量性が低いことや、種類の多い歯周病細菌の検査では煩雑となることといった問題点を残している。

本研究は、PCR 法のこれらの問題点を解決するために、増幅遺伝子量を経時的に測定することができるリアルタイム PCR 法と、土壌中の細菌叢の比較などに用いられている変性濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法を応用した歯周病細菌検査法を歯周病細菌の検査に適用して、病態解析や臨床応用の可能性を考察した。

【材料と方法】

I. リアルタイム PCR 法による歯周病細菌検査

- 1) 供試菌: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) ATCC 43718, *Actinomyces viscosus* (Av) ATCC 15987, *Escherichia coli* K-12, *Porphyromonas gingivalis* (Pg) ATCC 33277, *Treponema denticola* (Td) ATCC 35405, *Fusobacterium nucleatum* (Fn) ATCC 25586, *Prevotella intermedia* (Pi) ATCC 25611, *Prevotella nigrescens* ATCC 33563
- 2) プライマーとプローブの設計: Aa, Pg, Pi ならびに総細菌検出のためのプライマーとプローブ (TaqMan®プローブ) は 16SrDNA の塩基配列をもとに設計した。また、テトラサイクリン耐性菌検出のためのプライマーと TaqMan®プローブはテトラサイクリン耐性を規定する *tetQ* 遺伝子の塩基配列をもとに設計した。設計には Priemr Express® (PE Applied Biosystems) を使用した。
- 3) DNA 抽出: 培養細菌ならびに臨床プラークサンプルからの DNA 抽出は、InstaGene Matrix® (Bio-Rad) を用いて行った。抽出した DNA は、リアルタイム PCR 法による 16SrDNA 増幅の特異性、感度、そして定量性を調べるために、鋳型として使用した。
- 4) プラークサンプル: 岡山大学医学部・歯学部附属病院歯周科で supportive periodontal treatment 中の歯周病患者 8 名から、ペーパーポイントを用いて歯肉縁下プラークを採取した。歯周ポケットは 4.5mm の部位を選択して、塩酸ミノサイクリンの局所投与前ならびに投与一週後にそれぞれプラークの採取を行った。
- 5) リアルタイム PCR 反応: リアルタイム PCR は、増幅 DNA の検出に蛍光標識した TaqMan® プローブを用いる方法 (TaqMan assay) と DNA に取り込まれる SYBR Green®を使用する方法 (SYBR Green assay) の両者を用いて行った。それぞれの反応液は、市販されている Master mix (PE applied Biosystems) を用いて、説明書にしたがって調製した。DNA 増幅のための温度変化は、反応液を 95°C で 10 分インキュベートした後に 40 回の反応サイクル (95°C で 15 秒, 60°C で 1 分) とした。増幅 DNA 量は、反応サイクル毎に反応液の蛍光強度をモニタリングすることによって測定した。蛍光強度のモニタリングには GeneAmp®5700 Sequence

Detection System (PE Applied Biosystems) を使用し、データの解析には GeneAmp®5700 SDS software を使用した。

II. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 法による歯周病細菌検査

- 1) **プライマー**: 16SrDNA の保存領域の塩基配列をもとにすべての細菌種から遺伝子増幅が可能なプライマー（ユニバーサルプライマー）を設計した。Forward プライマーの 5'-末端には GC クランプ（cgccgcgcccgcgccgcggcgtccgcgcgccccgcgcgcg）を付与した。
- 2) **PCR**: 16SrDNA 増幅のための PCR 反応液は、ユニバーサルプライマー，鋳型となる培養細菌あるいはプラークサンプルから抽出した DNA と High Fidelity PCR Master Kit® （Roche Molecular Biochemicals）を用いて調整した。遺伝子増幅はタッチダウン法によるサーマルサイクルプログラムを用いて行った。
- 3) **電気泳動**: PCR によって増幅した 16SrDNA を，変性濃度勾配ポリアクリルアミドゲル中で塩基配列特異的に分離した。分離された DNA は，泳動後にゲルを臭化エチジウムにより染色して紫外線照射下で写真判定した。
- 4) **塩基配列の解析**: 変性ゲルによって展開された 16SrDNA 断片は，ゲルから切り出し，上記 PCR 法で再度増幅させたのち，pCR@2.1vector（Invitrogen, Carlsbad）に組み込んだ。組み込まれた遺伝子断片の塩基配列は，ABI Prism BigDye® terminator cycle sequencing ready kit と automated DNA sequencer（PE Applied Biosystems）を用いて解析した。
- 5) **相同性検索**: 解析した塩基配列は GenBank の homology search program に照会して，相同性分子とそれを持つ細菌種を同定した。
- 6) **細菌 DNA**: DNA サンプルは，岡山大学医学部・歯学部附属病院歯周科を受診した成人性歯周炎患者（3名）と若年性歯周炎患者（1名）由来の 11種のプラークサンプルと前述のリアルタイム PCR に用いた供試菌株から，前述の方法によって抽出した。

[結果]

I. リアルタイム PCR 法による細菌検査

- 1) 設計したプライマーによって標的とした菌種から抽出した DNA を鋳型とした場合にのみ、特異的に遺伝子増幅がみられた。
- 2) Aa, Pg ならびに Pi の定量的検出域は 10^{-10} cell であった。総細菌については 10^2 - 10^7 cell の間で定量検出が可能であり、*tetQ* 遺伝子については 10^{-10} copy の範囲で定量検出が可能であった。
- 3) 塩酸ミノサイクリン投与前後で歯肉縁下プラークの細菌叢を比較したところ、総菌数に変化はみられなかったが、総菌数に占める Aa, Pg, Pi の割合は減少傾向にあった。逆にプラーク中の *tetQ* 遺伝子は増加する傾向にあった。
- 4) 特異性と定量性において、TaqMan assay と SYBR-Green assay の間に差はなかった。

II. DGGE 法による細菌検査

- 1) 菌種に特異的バンドを検出することができた。Aa と Pg についてはバンドの位置が近接していた。
- 2) プラークサンプルの構成細菌叢を反映する泳動パターンを可視化できた。歯周ポケットが深いところは泳動パターンが複雑であった。一方、歯周ポケットの浅い部位から採取したプラークサンプルの泳動パターンは単純なものが多かった。
- 3) ゲル上の主要なバンドを切り出して DNA の相同性から細菌種を調べた結果、歯周ポケットの深い部位からは Pg が高頻度に検出された。一方、歯周ポケットの浅い部位からは *Streptococcus* 属や *Neisseria* 属が高頻度に検出された。

[考察]

リアルタイム PCR 法は、検出限界が $10\text{-}10^2$ cell レベルであり、感度と定量性が高い検査法である。このため、初診時の病的活動部位からの細菌検出はもちろんのこと、治療評価やメンテナンス期のように細菌数が少ない非活動的歯周ポケットからの細菌検出にも有用かもしれない。また外科的な歯周病治療が困難な癌や白血病などの易感染性宿主の場合、口腔内の細菌量を評価することが特に重要であるので、定量性を備えたリアルタイム PCR 法の有用性は高いと判断できる。さらに化学療法の薬剤選択と効果判定に際しても定量性の高い細菌検査法が必要であり、化学療法に伴う薬剤耐性遺伝子のモニタリングが重要であることが示された。リアルタイム PCR 法は高感度な定量検査法であるが、一度に対象とできる細菌種数に限りがある。そこで、患者の細菌叢の全体を捉えながら、その細菌叢を構成する主要な細菌種を同定することには、DGGE 法の活用が有効であると考ええる。検出限界は一般に 10^3 cell レベルであるうえに、菌種の同定には DNA シークエンス解析が必要であるので、種々の点で PCR を基調とした方法に劣る。しかし、細菌叢の全容をプロファイリングすることができる本法は、歯周病治療に伴う細菌叢の変化をモニタすることに有用である。

[結論]

リアルタイム PCR 法と DGGE 法を応用した歯周病細菌検査法を確立した。両法は歯周病の診断・評価や病態解析に活用できる可能性が高い。

論文審査結果の要旨

歯周病は複数の細菌感染によって起こる炎症性疾患である。したがって、歯周ポケット内細菌叢の解析は、歯周病の細菌学的病態解明や、診断、治療の評価、化学療法のタイミングと効果判定、あるいは歯周病活動期の予測のために重要である。この解析のためには、嫌気性菌の多い歯肉縁下プラーク中の細菌種を正確かつ迅速に同定するだけでなく、定量することが可能であり、かつ信頼性の高い臨床検査法が要求される。

近年、分子生物学的な手法を応用して、細菌検査法確立のための基礎的研究が広く行われるようになった。現在では、細菌の系統学的分類の指標として重要視されている 16S ribosomal RNA 遺伝子 (16SrDNA) を試験管内で増幅させるポリメラーゼ鎖反応 (PCR) 法が、細菌検査の主流となりつつある。PCR 法は高感度で特異性の高い方法であるが、定量性が低いことや、一度に標的とする菌種数に限界があるため細菌叢を網羅的に捉えることが難しいという問題点を残している。

本研究は、PCR 法のこれらの問題点を解決するために、増幅遺伝子量を経時的に測定することができるリアルタイム PCR 法と、土壌中の細菌叢の比較などに用いられている変性濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法を応用した歯周病細菌検査法を確立して、臨床応用の可能性を考察したものである。

申請論文は次の内容を示すものであった。

1. リアルタイム PCR 法による細菌検査：標的とする細菌種のみ特異的に検出できた。歯周病細菌 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg) および *Prevotella intermedia* (Pi) の定量的検出域は 10^{-10} - 10^7 cell であった。総細菌については 10^2 - 10^7 cell の間で定量検出が可能であり、*tetQ* については 10^{-10} - 10^7 copy の範囲で定量検出が可能であった。リアルタイム PCR 法による細菌検査を臨床へ応用して、抗生剤局所投与前後の歯肉縁下プラークの歯周病細菌と抗生剤耐性遺伝子をモニタリングできた。
2. DGGE 法による細菌検査：DGGE によって、歯周病細菌の 16SrDNA が菌種特異的に展開できた。DGGE 法を臨床へ応用して、歯肉縁下プラークの細菌叢を反映する泳動パターンとして可視化できた。そしてさらに、主要な細菌種を同定した。

これらの結果から、リアルタイムPCR法とDGGE法による歯周病細菌検査は、歯周病の細菌学的診断や治療効果の判定に活用できることが示唆された。そしてさらに、DGGE法によって患者個々の細菌叢をプロファイルした上でリアルタイムPCR法によってより厳密にモニタリングしていくという両方を組み合わせた活用の可能性を示唆している。

よって、本申請論文は学位論文として価値があると認めた。