

論文審査の結果の要旨

氏名：洪 性文

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：菌株レベルでの病原性解析を可能とする *P.gingivalis* および *T.forsythia* の分離・定量法の確立

審査委員：(主査) 教授 落合 智子

(副査) 教授 小方 頼昌

教授 福本 雅彦

本研究は、歯周炎の発症・進行に関与する *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) と *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) の両菌種を歯肉溝滲出液試料 (GCF) から高精度、かつ同時に分離・定量可能な選択培地を開発し、両菌種の分離・定量法の確立を行ったものである。

歯周炎は歯周局所における正常細菌叢バランスが破綻し、病的な細菌叢に変遷した結果、形成された細菌塊 (dysbiotic biofilms) によって引き起こされる歯槽骨の吸収を伴う歯周組織の炎症性病変である。歯周病関連細菌に関する研究報告はこれまで多くなされており、特に red complex と名付けられた特定の細菌種、*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *Treponema denticola* (*T. denticola*) が重度の歯周炎と有意に関連していることが明らかにされている。しかしながら、重度歯周炎と有意な相関を認める red complex 細菌を確実に分離可能な選択培地は未だ開発されていない。有用な選択培地が存在するならば、分離菌株を得ることができ、菌株レベルでの解析、すなわち病原マーカーの検索・解析が可能となると考えられる。

Tryptic soy agar にビタミン K₁ (10 mg/L)、ヘミン (5 mg/L)、L-システイン (800 mg/L)、0.5% yeast extract (5 g/L)、羊血液 (50 ml/L) を添加した CDC 血液寒天培地を基礎培地とした。この基礎培地に両菌種が感受性を示さなかったカナマイシン (250 mg/L)、ホスホマイシン (300 mg/L)、ポリミキシン B (50 mg/L)、ムピロシリン (2 mg/L)、TTC 試薬 (25 mg/L) を添加したものを選択培地とし、本選択培地を PGTFSM と命名した。また、*T. forsythia* を良好に発育させるために、試料を培地に塗抹後、培地上中央に直径 1 cm のペーパーディスクを置き、1.5% N-アセチルムラミン酸 (20 μL) をディスクに浸み込ませた後に培養を行うこととした。*P. gingivalis* を PGTFSM に塗抹・培養を行うと、本菌は円形でブラウンがかかった黒色のスムーズコロニーを形成した。また、*T. forsythia* は、*P. gingivalis* と比較して小さく、紫がかかった白色の円形で、中央が暗紫色を呈するスムーズコロニーを形成した。PGTFSM 上で、両菌種は特徴的な集落外観を呈するために、容易に両菌種を識別することが可能であった。CDC 血液寒天培地と比較して、PGTFSM は *P. gingivalis* と *T. forsythia* の全ての供試菌株において平均 97.1% と高い回収率を示した。さらに、PGTFSM は *P. gingivalis* と *T. forsythia* 以外の代表的な口腔細菌の発育を顕著に抑制した。そのため、今回確立した PGTFSM の選択性は優れていることが示された。

また、本研究では *P. gingivalis* と *T. forsythia* を迅速かつ正確に同定・検出することが可能な Direct Multiplex PCR 法の確立を試みた。本研究で開発した Direct Multiplex PCR 法による両菌種の同定と検出方法は、DNA 抽出作業が不要であり、試料採取から結果が得られるまでに要する時間は 2 時間以内、また PCR チューブ 1 つの PCR 反応で同時に 2 菌種検出可能であるために簡易性に優れ、高精度かつ迅速に結果が得られる有用な手法であると考えられた。

慢性歯周炎患者 30 名と歯周組織が健全な被験者 (歯周健全者) 30 名から GCF を採取し、PGTFSM による培養法、また本研究で確立した Direct Multiplex PCR 法の 2 つの方法を用いて、GCF 試料中から *P. gingivalis* と *T. forsythia* の検出を試み、それぞれの検出結果に対して比較検討した。Direct Multiplex PCR 法と PGTFSM を用いた培養法による両細菌の検出結果に差は認められず、また各方法によって検出または未検出の被験者も同一であった。歯周健全者では *P. gingivalis* は 3 名 (10%)、*T. forsythia* は 5 名 (16.7%) から検出された。一方、慢性歯周炎患者では *P. gingivalis* は 18 名 (60%)、*T. forsythia* は 28 名 (93.3%) の被験者から検出され、歯周健全者と比較して両菌種の検出頻度は高かった。また、両群において両菌種ともに検出され

る傾向が強く、さらに *P. gingivalis* よりも *T. forsythia* の検出頻度が高かった。

以上のことから下記の結論を得た。

1. 本研究において開発した *P. gingivalis*・*T. forsythia* 選択培地 (PGTFSM) は、優れた選択性と高い回収率を示したことから、ヒト口腔より本菌種を分離するために有用であるものと判断された。
2. 本研究で確立した Direct Multiplex PCR 法により *P. gingivalis* および *T. forsythia* の同定・検出方法は簡易性に優れ、高精度かつ迅速な結果が得られる有用な手法であることが推察された。

本研究は、疾患特異的病原マーカーを特定し、歯周病の診断や治療効果の即時判定に有用な細菌検査を確立する上で、基礎的知見を提供し、将来の臨床医学の礎となることが大いに期待されるものである。よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和2年3月19日