

論文の内容の要旨

氏名：北野 太一

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Improved LAMP (loop-mediated isothermal amplification) and immunohistochemistry for detecting *Porphyromonas gingivalis* in periapical periodontitis
(改良した LAMP (loop-mediated isothermal amplification) および免疫組織化学による根尖性歯周炎からの *Porphyromonas gingivalis* の検出)

根尖性歯周炎の病変部には *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) が高い確率で存在し、病変の進行に関与することが示唆されている。しかしながら、これまでの報告では、*P. gingivalis* の検出は根管滲出液を sample として細菌培養法ならびに PCR をはじめとする分子生物学的手法から行われており、病変部を直接検索した報告はほとんどない。さらに、その病変部における *P. gingivalis* の詳細な局在は不明である。そこで、根尖性歯周炎の一病態である歯根嚢胞から直接的かつ高感度な *P. gingivalis* の検出法を検討した。

本研究では *P. gingivalis* の検出において LAMP と PCR を組み合わせた新たな方法 (PCR-LAMP) を開発した。また、*P. gingivalis* 特異的抗体を用いた免疫組織化学 (immunohistochemistry: IHC) を用いて PCR-LAMP の特異性を確認するとともに、*P. gingivalis* の局在を検討した。

LAMP は、迅速、簡易、正確な遺伝子増幅法である。標的遺伝子の 6 つの領域に対して 4 種類の primer を設定して増幅反応を行うことによって高い特異度を担保する。使用する耐熱性 *Bst* DNA Polymerase の鎖置換活性を利用して一定温度で反応することを特徴とし、thermal cycler のような特殊な装置を必要としない。さらに、増幅反応が乗数的に行われるため、反応時間が短く概ね 60 分以内で終了する。増幅反応の有無は、反応副産物のピロリン酸マグネシウムを目視することで行なえる。また real-time 濁度計を検出装置として使用することにより、検出までの工程を 1 ステップで行うことができる。本研究では LAMP 用 Primer (FIP, BIP, F3 primer, B3 primer, LF primer) を GenBank (AB035459) から入手した *P. gingivalis* (ATCC 33277 株) の 16S rRNA 遺伝子の DNA 配列をもとに primer 設計ソフトウェアである Primer explorer v4 を用いて設計した。さらに、これらの primer による *P. gingivalis* 以外の菌体に対する非特異的増幅の有無を確認する目的で、*P. gingivalis* を含む 7 種の口腔常在細菌から Genomic DNA (gDNA) を精製し、これを鋳型として LAMP を行った。*P. gingivalis* 以外の 6 種の口腔常在細菌として *Streptococcus salivarius* (HHT 株), *Staphylococcus aureus* (209P 株), *Enterococcus faecalis* (JCM 5803 株), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Y4 株), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586 株) および *Porphyromonas endodontalis* (JCM 8526 株) を用いた。110 検体の歯根嚢胞のホルマリン固定パラフィン包埋標本 (FFPE 標本) を用いた。ReliaPrep. FFPE gDNA Miniprep System を用い、FFPE 標本より gDNA を抽出して sample とした。LAMP 反応は 62 °C 60 min の条件で、real-time 濁度計を用い、濁度が 0.1 を超えた sample を陽性とした。また、反応基材は Loopamp DNA amplification kit を用いた。

LAMP を改良した PCR-LAMP は 2 つのステップから構成される。第 1 段階として、PCR によって標的 DNA を増幅した。PCR は Emerald AMP を反応基材として 94 °C 30 sec 48 °C 2 min 74 °C 30 sec の条件で 40 cycle 行った。最終伸長は 74 °C 7 min とした。第 2 段階として、PCR 増幅産物を LAMP でさらに増幅した。第 1 段階の PCR で増幅される領域は第 2 段階の LAMP で必要とされる領域とした。使用する primer は上記の LAMP 用のものと同一である。また、反応条件も同一である。

LAMP は上記の 7 菌種のうち *P. gingivalis* のみを特異的に増幅し、その検出限界は 21 copies/tube であった。LAMP の妥当性を評価するために positive control の LAMP 増幅産物をアガロースゲルで電気泳動したところ、特徴的なラダー状の泳動像を示した。また、増幅産物を制限酵素 (*Acc* II) で切断しアガロースゲルで電気泳動したところ、泳動像は 2 本のバンドに収束した。これらの結果は LAMP の妥当性を支持するものである。しかし LAMP および PCR 単独では FFPE 標本から *P. gingivalis* を検出することはできなかった。一方、PCR-LAMP では検出限界は 2 copies/tube であり、きわめて高い感度

で検出することができた。さらに、PCR-LAMP は 110 例中 67 例の FFPE 標本から *P. gingivalis* を検出した。次に、PCR-LAMP による増幅産物が *P. gingivalis* 特異的であることを確認するために、LAMP の際と同様にアガロースゲル電気泳動と制限酵素処理後の電気泳動を行い、同じ結果が得られた。これらの結果は、PCR-LAMP の妥当性を支持するものである。さらに、IHC では 110 症例中 14 症例が *P. gingivalis* 陽性を示し、そのすべては、PCR-LAMP において *P. gingivalis* 陽性を示した症例であった。これらの結果は、PCR-LAMP の特異性を支持するものである。また、IHC からは、歯根嚢胞の嚢胞壁の肉芽組織中に *P. gingivalis* と macrophage が共局在することが示された。

PCR-LAMP は検出感度および特異度が高く、手法は比較的容易である。さらに、第 2 段階は最短 30 分程度ですべての工程を終了することができる。また、反応の結果は濁度で明瞭に示され、電気泳動等の手順が不要である。本研究の結果から、最も標準的な病理組織の保存方法である FFPE 標本から特定の標的 DNA の検出において、PCR-LAMP は有用な方法であると考えられ、医療への幅広い応用の可能性が示された。さらに、本研究では、歯根嚢胞中の *P. gingivalis* の陽性率が従来の報告と比較して高い結果となった。また、IHC によって、歯根嚢胞の嚢胞壁の肉芽組織中に *P. gingivalis* が macrophage と共存することが示された。以上のことから、*P. gingivalis* が根尖性歯周炎から歯根嚢胞に発展するさいの増悪因子の一つであることが推測された。ヒトの歯根嚢胞を含めた根尖性歯周炎等の病変部において、*P. gingivalis* の詳細な局在が示された報告はなく、本研究から得られた結果は、今後の当該研究分野の進展に貢献することが期待される。