

論文審査の結果の要旨

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)

審査委員：(主査) 教授 大木 秀郎

(副査) 教授 浅野 正岳

教授 佐藤 秀一

教授 鈴木 直人

Porphyromonas gingivalis (以下 *P. gingivalis*) が根尖病巣に高い確率で存在し、病変の進行に関与することを示唆する報告がいくつか存在する。それらの報告では根管滲出液を用い、細菌培養ないし PCR 等の手法によって *P. gingivalis* を検索しているが、病巣部における *P. gingivalis* の局在については不明である。そこで、本研究では根尖病巣そのものを検索対象とし、免疫組織学および分子生物学的方法を用いて *P. gingivalis* の検出を試みた。

LAMP は迅速、簡易、正確な遺伝子増幅法である。感度、特異度が高く、同一温度で反応が進行するため特殊な装置を必要とせず、増幅から検出まで 1 ステップで行なえる等の利点がある。そこで、本研究では遺伝子増幅・検出法として LAMP を選択した。

検体として病理学的に歯根嚢胞と診断されたホルマリン固定パラフィン包埋標本 (以下 FFPE 標本) 110 症例を用いた (倫許 2013-8)。GenBank から得た *P. gingivalis* の特異的 DNA 配列情報をもとに、Primer Explorer v4 を用いて LAMP プライマーを作製した。*P. gingivalis* 以外の口腔常在菌 7 種を用いて行った LAMP では遺伝子増幅が認められなかった。一方、*P. gingivalis* を用いて得た増幅産物のシーケンス解析から、作製したプライマーが *P. gingivalis* 遺伝子を特異的に増幅することが証明された。そこで FFPE 標本中の *P. gingivalis* の検出を試みたが、LAMP 単体では検出することができなかった。

この問題を解決するために PCR と LAMP を組み合わせた PCR-LAMP を考案した。第 1 段階として PCR による遺伝子増幅を行い、第 2 段階で LAMP による遺伝子増幅および検出を行った。その結果、PCR-LAMP での検出は特異性が極めて高く、かつ LAMP と比較して検出感度が高いことが明らかとなった。そこで、PCR-LAMP による FFPE 標本からの検出を試みたところ、*P. gingivalis* を検出することができ、110 例中 67 例 (60.9%) が陽性であった。さらに増幅産物のシーケンス解析により PCR-LAMP が正確に *P. gingivalis* を検出することを確認した。

次に、根尖性歯周炎での *P. gingivalis* の局在を検討するために抗 *P. gingivalis* 抗体を用いて免疫組織染色を行った。その結果、110 症例中 14 症例 (12.7%) が陽性であった。免疫組織染色陽性例はすべて PCR-LAMP 陽性例であることから PCR-LAMP の妥当性が示された。また、陽性反応は歯根嚢胞の嚢胞壁の肉芽組織中に存在するマクロファージ様細胞の細胞質中に認められた。

本研究の結果、PCR-LAMP は標準的な病理組織切片である FFPE 標本から、*P. gingivalis* のような微量な DNA の検出が可能であることが示された。この手法は、医療をはじめとする幅広い分野への応用が可能であるとともに、根尖性歯周炎における *P. gingivalis* の局在についての新たな知見は当該分野の発展に寄与するものと期待される。

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

平成 29 年 3 月 8 日