

学 位 論 文 題 名

Development of a polymerase chain reaction assay for
Mycoplasma salivarium by using the nucleotide
sequence within aminopeptidase My gene

（アミノペプチダーゼ遺伝子の塩基配列をもとにした *Mycoplasma salivarium* の PCR 法による検出方法の確立）

学位論文内容の要旨

*Mycoplasma salivarium*はヒト口腔に生息するマイコプラズマで、口腔感染症において症例によっては病因的に強くかかわっていることが示唆されている。また、*M. salivarium*と顎関節疾患との関連を疑わせる成績も得られているが、*M. salivarium*が顎関節腔に存在することは現時点では証明されていない。顎関節腔からの*M. salivarium*の分離培養が不成功に終わっている理由のひとつとして、関節腔から得られる試料が微量であることが考えられる。そこで、本研究では微量な試料から迅速にしかも特異的に*M. salivarium*を検出するための方法として*M. salivarium*に特異的なPCR法の開発を試みた。

＜方法＞

供試微生物株：マイコプラズマとして、*M. salivarium* ATCC 23064、*M. salivarium* ATCC 33130、*M. hominis* ATCC 23114、*M. faucium* ATCC 25293、*M. orale* ATCC 15539、*M. buccale* ATCC 23636、*M. genitalium* ATCC 33530、*M. pneumoniae* ATCC 15531、*M. pneumoniae* ATCC 15492、*M. fermentans* ATCC19989、*M. pirum* ATCC 25960、*M. arthritidis* ATCC 19611ならびに *Ureaplasma urealyticum* T 960を用いた。一般細菌として、*Streptococcus mitis* ATCC 9811、*S. salivarius* ATCC 9222、*S. pyogenes* IID 689、*S. mutans* JC 2、*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277、*Actinomyces naeslundii* ATCC 93104、*Proteus vulgaris* IID 874ならびに *Bacillus subtilis* IID 864を用いた。

供試細胞株：哺乳類由来細胞株として、Gin-1 (ATCC CRL-1292)、U937 (ATCC CRL-1593)、Raji (ATCC CCL-86)ならびにマウス脾臓からナイロンウールカラムで調製したTリンパ球を用いた。

DNA調製：マイコプラズマ細胞、グラム陰性菌ならびに哺乳類細胞からのDNAは、SDS存在下で細胞をproteinase K処理した後、phenol/chloroform処理を行い、最後にethanol沈殿を行い、調製した。グラム陽性菌からのDNAは、Pitcherらの方法 (Lett. Appl. Microbiol. 8: 151-156, 1989)に準じて調製した。

PCR法：PCRは自動DNAサーマルサイクラーを用い、5 μ lのサンプルを含む50 μ lの反応液 (0.25 UのEX Taq polymerase、0.2 mMのdNTPならびに20 μ Mのプライマーを含む)で、94 $^{\circ}$ Cで30秒間、60 $^{\circ}$ Cで1分間および72 $^{\circ}$ Cで2分間の処理を40サイクル行うことによりDNAを増幅した。合成オリゴヌクレオチドプライマーはOligo DNA RP4

カラムによるHPLC精製を行い、使用した。

唾液の採取：唾液は北大歯学部小児歯科を訪れた7人の小児（男子5人、女子2人、5～10歳）と北大歯学部学生7人（男性4人、女性3人、23～25歳）から滅菌コットンスワブで下顎第一大臼歯相当部の口腔底部より採取した。スワブは1.0 mlの滅菌PBSに浸して、-80℃で保存した。

唾液からのDNA調製：-80℃で保存したスワブを融解し、激しく攪拌した後、その200 µlより上述した方法に準じてDNAを調製した。

唾液からのマイコプラズマの分離培養：-80℃で保存したスワブを融解し、滅菌PBSで唾液の10倍連続希釈系列をつくり、Hayflick寒天培地に接種した。37℃で7日間、80% N₂-12% CO₂-8% H₂環境下で培養し、マイコプラズマのコロニーが生じたサンプルを陽性と判定した。

＜結果ならびに考察＞

マイコプラズマのアミノペプチダーゼ My遺伝子の塩基配列 (FEMS Microbiol. Lett. 130: 19-24, 1995) をもとに幾つかのプライマーセットを合成し、種々のマイコプラズマ、細菌および培養細胞から調製したDNAを用いてPCRを行った。その結果、アミノペプチダーゼ My遺伝子の開始コドンから数えて1021番目から1041番目までの 5'-gcaacattaactggaactat-3' (sal-1) をforward プライマー、1320番目から1336番目までの 5'-tgccctaaccctattccc-3' (sal-2) をreverse プライマーとすることにより、*M. salivarium* に特異的な278bpのDNA断片が増幅されることが明らかとなった。サザンブロットング用のプローブとして、1148番目から1165番目までの 5'-aatcttcattgcaaggca-3' (sal-p) を用いた。このPCR法による *M. salivarium* のDNAの検出限界は10 fg で、これはマイコプラズマでは10細胞分のDNA量に相当する。このように、sal-1ならびにsal-2をプライマーとして、sal-pをサザンブロットング用のプローブとして用いたPCR (Sal-PCR) 法により、*M. salivarium* が特異的にしかも迅速に検出された。

唾液からの *M. salivarium* の検出をSal-PCR法ならびに培養法で試みた。Sal-PCR法では、14サンプルのうち7サンプル（小児2、大人5）から *M. salivarium* に特異的な278 bpの断片が認められ、これらはすべてsal-pと反応した。培養法では、マイコプラズマが分離されたのは14サンプルのうち3サンプルであり、そのうち2サンプルはSal-PCR法では陰性であり、*M. salivarium* とは別のマイコプラズマが生息していたものと推測された。このように、sal-PCR法による唾液からの *M. salivarium* の検出率は培養法のそれに比べてはるかに高いことがわかった。

マイコプラズマの分離培養から同定までには、他の細菌の場合とは比較にならない程に微生物学的手技の習熟度と豊富な経験を必要とし、多大な労力と長い時間そして重い経済的負担を伴う。今回開発したsal-PCR法は、このような障壁を取り除き、特別の習熟度と経験を要せず、微量な臨床材料から *M. salivarium* を迅速にしかも特異的に検出でき、今後の *M. salivarium* の研究に大いに寄与するものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 渡 邊 継 男

副 査 教 授 松 本 章

学 位 論 文 題 名

Development of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma salivarium* by using the nucleotide sequence within aminopeptidase My gene

(アミノペプチダーゼ遺伝子の塩基配列をもとにした *Mycoplasma*
salivarium の PCR 法による検出方法の確立)

審査は、提出論文とそれに関連した学科目について、申請者に対して各審査員が個別に口頭試問により行い、各審査員の報告を下に主査がその結果をまとめた。審査論文の概要は以下の通りである。

M. salivarium はヒト口腔に生息するマイコプラズマで、口腔感染症の一部においては病因的に強く関わっていることが示唆されている。しかし、マイコプラズマは寄生性が強く、その分離培養には栄養価の高い培地と長い培養期間が必要であり、また細菌とは異なり、細胞や集落の形態、生化学的性状等からその種類を鑑別することが不可能なことから、現時点ではその存在を証明することは容易ではない。最近、いくつかのマイコプラズマについては、迅速で特異的な分析法としてPCR法が好んで用いられているが、*M. salivarium* に対するPCR法は確立されていない。本研究は、微量な試料から迅速かつ特異的に*M. salivarium*を検出する方法の確立を目的として、*M. salivarium*に特異的なPCR法の開発を試みたものである。

まず、マイコプラズマのアミノペプチダーゼ My 遺伝子の塩基配列 (FEMS Microbiol. Lett. 130: 19-24, 1995) をもとに幾つかのプライマーセットを合成し、2種類の*M. salivarium*を含む13種類のマイコプラズマ、8種類の細菌及び4種類の哺乳類培養細胞から調整したDNAを用いてPCRを行った。DNAの調整は、マイコプラズマ細胞、グラム陰性菌及び哺乳類細胞では、SDS存在下で細胞をproteinase K処理した後、phenol/ chloroform処理を行い、最後にethanol沈殿を行い、グラム陽性菌についてはPitcherらの方法に準じた。PCRは、自動DNAサーマルサイクラーを用い、5 μ lのサンプルを含む50 μ lの反応液 (0.25 UのEX Taq polymerase、0.2 mMのdNTPならびに20 μ lのプライマーを含む)で、94 $^{\circ}$ C30秒間、60 $^{\circ}$ C1分間および72 $^{\circ}$ C2分間の処理を40サイクル行うことによりDNAを増幅した。合成オリゴヌクレオチドプライマーはOligo DNA RP4カラムによるHPLC精製を行って使用した。

その結果、アミノペプチダーゼMy遺伝子の開始コドンから数えて1021番目から1041番目までの5'-gcaacattaactggaactat-3' (sal-1)をforwardプライマー、1320番目から1336番目までの5'-tgcctaacccttccc-3' (sal-2)をreverseプライマーとすることにより、*M. salivarium*に特異的な278bpのDNA断片が増幅されることが明らかとなり、さらに1148番目から1165番目までの5'-aatcttcattgcaaaggca-3' (sal-p)をサザンブロッティング用の

プローブとして用いたPCR(sal-PCR)法により、*M. salivarium*が特異的かつ迅速に検出されることが明らかとなった。この方法による*M. salivarium*のDNAの検出限界は10 fgで、これはマイコプラズマでは10細胞分のDNA量に相当する。次に、本学部附属病院の小児患者7人（男子5人、女子2人、5～10歳）と本学部学生7人（男性4人、女性3人、23～25歳）から滅菌スワブを用いて唾液を採取し、唾液からの*M. salivarium*の検出をSal-PCR法ならびに培養法で試みた。スワブは1.0 mlの滅菌PBSに浸して-80℃で保存し、唾液からのDNA調製は-80℃で保存したスワブを融解し、激しく攪拌した後、その200 μlより上述した方法に準じて行った。唾液からのマイコプラズマの分離培養は、スワブ融解後、滅菌PBSで唾液の10倍連続希釈系列をつくり、Hayflick寒天培地に接種し、37℃で7日間、80% N₂-12% CO₂-8% H₂環境下で培養し、マイコプラズマのコロニーが生じたサンプルを陽性と判定した。

その結果、14サンプル中7サンプル（小児2、大人5）から*M. salivarium*に特異的な278 bpの断片が認められ、これらはすべてsal-pと反応した。培養法では、マイコプラズマが分離されたのは14サンプル中3サンプルであり、そのうち2サンプルはsal-PCR法では陰性であり、*M. salivarium*とは別のマイコプラズマが生息していたものと推測された。このように、sal-PCR法による唾液からの*M. salivarium*の検出率は培養法のそれに比べてはるかに高いことが明らかとなった。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。マイコプラズマの分離培養から同定までには、他の細菌の場合とは比較にならない程に微生物学的手技の習熟度と豊富な経験を必要とし、多大な労力と長い時間そして重い経済的負担を伴う。本研究は、このような障壁を取り除き、特別の習熟度と経験を要せず、微量な臨床材料から*M. salivarium*を迅速にしかも特異的に検出できる検査法を開発したことが高く評価された。また、その成果を英文でまとめ、ヨーロッパにおける微生物学会機関誌の一つであるFEMS Microbiology letterに採択されたことも、本研究の質の高さを示すものとして評価された。本研究の業績は、口腔外科学や口腔微生物学の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。