

学 位 研 究 紹 介

Pseudoramibacter alactolyticus* 臨床分離株からの 16S rDNA における遺伝学的特異性*Phylogenetic characterization of 16S rDNA from *Pseudoramibacter alactolyticus* clinical isolates**

新潟大学歯学部歯科保存学第一講座

田村貴彦

Department of Operative Dentistry and Endodontics

Niigata University Faculty of Dentistry

Takahiko Tamura

緒 言

軟化したウ蝕象牙質病巣や感染根管病巣，歯周ポケットから高頻度に分離される偏性嫌気性グラム陽性桿菌，*Pseudoramibacter alactolyticus* (旧 *Eubacterium alactolyticum*) は，その特徴からウ蝕や歯周疾患病原性との関連が注目されている。このような偏性嫌気性グラム陽性桿菌 (旧 *Eubacterium* 属) の細菌種は，培養困難な菌種が多く，その分離の報告も多くないが嫌気性菌に留意した精密な研究により分離部位，同定基準，性状等が明らかになってきている。しかし，本菌種は終末代謝産物としてカプロン酸産生を主たる分類基準としているため，乳酸代謝能の相違など種々の異なる性状をもつ多様な菌株が混在する可能性が示唆されていた。

そこで本研究では，*P. alactolyticus* の 16S ribosomal RNA gene (16S rDNA) についてrestriction fragment-length polymorphism (RFLP) 分析，及びそのシーケンス解析を行い，類似する嫌気性グラム陽性桿菌種，並びに種々の口腔細菌との遺伝学的類縁性を明らかにすると同時に，従来 *P. alactolyticus* と同定されていた菌株における 16S rDNA の遺伝学的特異性を検討した。

材料及び方法

P. alactolyticus ATCC 基準株と *E. alactolyticum* と同定されていた臨床分離株 79 株，計 80 株を用いた。InstaGene Matrix にて菌体より DNA を抽出，ユニバーサルプライマーを用いて polymerase chain reaction (PCR) 法にて 16S rDNA を増幅した。RFLP 分析では，

16S rDNA を制限酵素 *Hpa*II にて処理した後，その断片を 2% アガロースゲルによる電気泳動パターンを比較，検討した。また，Thermo Sequence fluorescent labelled primer Cycle Sequence Kit にて蛍光標識したプライマーを用いる Dye Primer 法にて 16S rDNA を PCR を行い，その産物をオートシーケンサー ALF expressTM にてシーケンス解析を行った。得られたシーケンスデータは解析ソフト Lasergene (DNASTAR) にて GenBank から得た類縁の細菌種のデータとともに相互に比較，検討し，neighbor-joining method によるその類似性や進化系統樹の作成などの遺伝学的相関の解析を行った。

結果及び考察

本研究に用いた被験菌株 80 株は類似した性状をもつが，16S rDNA の RFLP 分析の結果，ATCC23263 基準株を代表とする a 型，146-3 株を代表とする b 型，9p-21 株を代表とする c 型の 3 つのグループに分かれた。臨床分離株 79 株のうちでは b 型が，最も多く検出 (55 株，69%) され，ウ蝕象牙質，感染根管壁，歯周ポケットのいずれの部位において最も多く分離された。a 型 (22 株)，c 型 (3 株) は主にそれぞれ歯周ポケット，感染根管から分離されており，型によって分布頻度や検出部位が異なっていた。a，b，c の各型の菌株は，乳酸分解能などの生物学的性状が異なっており，型の違いによるウ蝕，歯内疾患，歯周疾患への関与等を明らかにする必要性が示唆された。

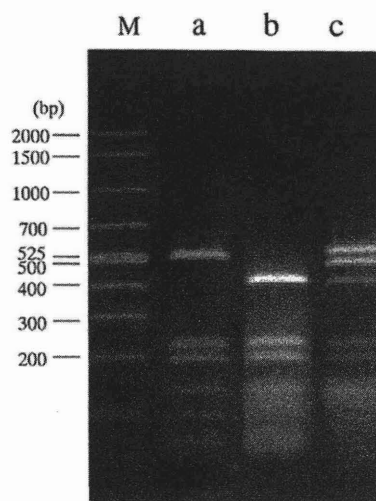


図 1 制限酵素 *Hpa*II による *P. alactolyticus* の PCR-RFLP 分析
a 型 : *P. alactolyticus* ATCC23263^T,
b 型 : 146-3, c 型 : 9p-21, M : マーカ-

表1 *P. alactolyticus*の分離部位

Source \ Type	RFLP-type			Total
	a	b	c	
Infected dentine	1	6	0	7
Infected root canal dentine	4	25	3	32
Periodontal pockets	16	24	0	40
Total	21	55	3	79

一方，ATCC23263 基準株（a 型），146-3株（b 型），9p-21株（c 型）の16S rDNAのシーケンスを調べた結果，ATCC菌種基準株（a 型）に対し，bは98.2%，cは98.0%と類似性が高く，いずれの臨床分離菌も新しい分類での*P. alactolyticus*に相当することが示された。しかしながら，他の嫌気性グラム陽性桿菌の菌属種やGenBankに登録されている類縁とおもわれる菌属種とは，明らかに異なっていた。

本研究の成果により，いずれの型にも共通する16S rDNAシーケンスを本菌種の菌種特異的な共通の領域として使用することが可能であり，簡便，且つ特異的な検出法の確立に応用できる出来ると思われる。

表2 *P. alactolyticus*の16S rDNAにおける遺伝学的類縁性

Species	% similarity to :								
	ATCC 23263 ^T	146-3	9p-21	<i>E.</i> <i>limosum</i>	<i>E.</i> <i>callanderi</i>	<i>E.</i> <i>barkeri</i>	<i>A.</i> <i>bakii</i>	<i>E.</i> <i>timidum</i>	<i>E.</i> <i>angustum</i>
<i>P. alactolyticus</i>									
a : ATCC23263 ^T		98.2	98.0	88.0	87.2	89.4	85.4	71.4	79.6
b : 146-3			99.4	88.8	88.3	89.9	84.6	74.2	81.1
c : 9p-21				88.3	88.1	89.4	84.8	73.0	80.4
<i>Eubacterium limosum</i>					97.6	91.7	87.6	70.2	78.9
<i>Eubacterium callanderi</i>						92.3	91.4	71.0	77.8
<i>Eubacterium barkeri</i>							88.5	69.9	78.5
<i>Acetobacterium bakii</i>								67.8	75.5
<i>Eubacterium timidum</i>									75.9
<i>Eubacterium angustum</i>									