



LASERGENE の Seqman を用いた。決定したシ? クエンスは、LASERGENE の Megalign を用いて、GenBank に登録されている 16S rDNA のシ? クエンスと比較し、その類似性を求めた。

結果と考察： G C比は 35 mol% の 3 株と、45-47 mol% の 8 株の二群に分かれた。*Dialister* 属の基準細菌種である *D. pneumosintes* の基準細菌株 ATCC 33048 株は、35 mol% の G C 比であり、これと明確に異なる 45-47 mol% の 8 株は *Dialister* とは異なる細菌属の細菌種と考えられた。

7 株の臨床分離株 (9-74, C11b-g, 7-92, UJB13e-1, BN11a-k, 1-18, 9-67) は、それぞれ相互に高い類似性を示し、かつ、登録されている “*D. invisus*” の 16S rDNA のシ? クエンスとも 98.1% 以上 (98.1- 99.4 %) の類似性を示し、“*D. invisus*” と同じ分類に属すると考えられた。しかしながら、*Dialister* 属の基準細菌種である *D. pneumosintes* の基準細菌株 ATCC 33048 株とは、90-91% 台の類似性であり、G C 比の結果からも、“*D. invisus*” は、*Dialister* とは異なる細菌属とするべきであると考えられた。他の一株 (P11a-i) は 47 mol% の G C 比を示し、かつ “*D. invisus*” の 16S rDNA のシ? クエンスと高い類似性を示したが、98.0% 以上の類似性は無く、新しい細菌種と思われる。

G C 比が 35 mol% の 2 株のうちの 1 株 (9-73) は、*D. pneumosintes* の 16S rDNA のシ? クエンスと高い類似性を示したが、98.0% 以上の類似性は無く、新しい細菌種と思われる。もう 1 株 (AB13a-h) は、35 mol% の G C 比ながら、*D. pneumosintes* の 16S rDNA のシ? クエンスとは 90% 以下の類似性で、むしろ “*D. invisus*” の 16S rDNA のシ? クエンスと高い類似性を示した。したがって、この株も新しい分類学的位置が必要と考えられた。

#### 審査結果の要旨

多種多様な細菌が生息している口腔細菌の圧倒的多数は厳密な嫌気条件を必須とする嫌気性菌で構成されている。近年の嫌気性菌培養技術の進展により、その多くを培養することができるようになってきている。これらの中には、創意工夫によって極めて培養が困難な細菌種を分離・培養する事ができるようになった新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔環境・感染防御学分野を含む幾つかの研究室でのみ分離・培養が可能になった細菌属種もあり、その多くが新種、例えば、新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔環境・感染防御学分野では糖非分解性グラム陽性桿菌群である *Eubacterium minutum*, *Eubacterium saphenum*, *Mogibacterium timidum*, *M. diversum*, *M. neglectum*, *M. vescum*, *M. pumilum*, *Cryptobacterium curtum*, *E. exiguum* (その後 *Slackia exigua* に再分類) を新種であるとして報告している。

しかしながら、未だ培養が極めて困難な細菌種が存在していると考えられている。そのため、細菌自身の分離・培養をせずに、病巣から細菌の DNA 断片を取り出し、増幅し、その塩基配列 (シークエンス)、特に 16S rDNA のシークエンスを解析し、既存のデータと比較することで細菌属種を推定する PCR 法が用いられている。この方法により、従来確立された細菌種とは明確に異なる 16S rDNA 断片が、歯内病変部や深い歯周ポケットから採取した試料中から頻度高く検出され、糖非分解性嫌気性グラム陰性短桿菌種である *Dialister pneumosintes* の 16S rDNA のシークエンスと類似している事が示されている。したがって、この様な 16S rDNA を持つ細菌種が、歯内疾患や歯周疾患の病巣部に優勢に生育し、歯内疾患や歯周疾患に密接に関連している事が示唆されている。

この様な糖非分解性嫌気性グラム陰性短桿菌種もやはり、新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔環境・感染防御学分野での創意工夫によって、歯内病変部や深い歯周ポケットから分離・培養が可能となり、これらの細菌種から十分量の DNA を抽出し、16S rDNA の

全体のシーケンスを解析する事が可能となった。

この論文は、極めて培養の困難な、歯内疾患や歯周疾患の病巣部から分離された、糖非分解性偏性嫌気性グラム陰性球桿菌について、PCR法をもちいて、これらの細菌の16S rDNAのシーケンスを分析し、その細菌分類学的解析を加えている。

本論文では、分離した10株の糖非分解性偏性嫌気性グラム陰性球桿菌について、そのDNAをインスタジーンを用いて抽出し、そのGC構成比、また、16S rDNAのユニバーサルプライマー(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3':*E. coli*での8-27位に相当、および3'-TTC AGC ATT GTT CCA TYG GCAT-5':*E. coli*での1492-1513位に相当)を用い、PCR法によって16S rDNAを増幅し、これを鋳型DNAとして、DNAシーケンサーを用いて塩基配列を決定している。その分析データは、16S rDNAのシーケンス解析ソフトであるLASERGENEのSeqmanを用い、LASERGENEのMegalignを用いて、GenBankに登録されている16S rDNAのシーケンスと比較し、その類似性を求めている。その結果、検討した10株の被験細菌は、GC比35 mol%の2株と、45-47 mol%の8株の二群に分かれ、16S rDNAのシーケンス解析の結果は、4種に分かれた。8株は、現在、*D. invisus*と分類されている菌種に類似性が極めて高いが、*Dialister*属の標準菌株である*Dialister pneumosintes*とは類似性が低く、新しい菌属の新設が必要としている。残りの2株は、*Dialister pneumosintes*と類似性が高いが、これと同一とするには変異が高く、やはり、新しい菌属、菌種の新設が必要と結論している。

この様に、本論文は、歯周疾患や歯内疾患に原因究明に必須な科学的情報を提供している。また、新しい細菌属種の新設を提唱するなど、多くのノイエスを含んでおり、歯学の進展に寄与している。従って、本論文は、博士の学位を授与するに十分な新知見を含んでいる、博士に称号を授与するにふさわしい論文であると結論する事ができる。