

# Rapid and Sensitive PCR-Dipstick DNA Chromatography for Multiplex Analysis of the Oral Microbiota

著者	田 玲錫
号	45
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	歯博第768号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00126716">http://hdl.handle.net/10097/00126716</a>

氏名(本籍) : 田 玲 錫 (中国)

学位の種類 : 博士 ( 歯 学 )                      学位記番号 : 歯 博 第 7 6 8 号

学位授与年月日 : 2016 年 9 月 26 日                      学位授与の要件 : 学位規則第4条第1項該当

研究科・専攻 : 東北大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯科学専攻

学位論文題目 : Rapid and Sensitive PRC-Dipstick DNA Chromatography for  
Multiplex Analysis of the Oral Microbiota ( 迅 速 ・ 高 感 度 PCR-  
Dipstick DNA クロマトグラフィーを用いた口腔細菌叢からの多菌種一  
斉分析)

論文審査委員 : (主査) 教授 佐々木 啓 一  
教授 江 草                      宏                      教授 高 橋 信 博

## 論文内容要旨

A complex of species has been associated with dental caries under the ecological hypothesis. This study aimed to develop a rapid, sensitive PCR-dipstick DNA chromatography assay that could be read by eye for multiplex and semiquantitative analysis of plaque bacteria. Parallel oligonucleotides were immobilized on a dipstick strip for multiplex analysis of target DNA sequences of the caries associated bacteria, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Scardovia wiggisiae*, *Actinomyces* species, and *Veillonella parvula*. Streptavidin-coated blue-colored latex microspheres were to generate signal. Target DNA amplicons with an oligonucleotide-tagged terminus and a biotinylated terminus were coupled with latex beads through a streptavidin-biotin interaction and then hybridized with complementary oligonucleotides on the strip. The accumulation of captured latex beads on the test and control lines produced blue bands, enabling visual detection with the naked eye. The PCR-dipstick DNA chromatography detected quantities as low as 100 pg of DNA amplicons and demonstrated 10- to 1000-fold higher sensitivity than PCR-agarose gel electrophoresis, depending on the target bacterial species. Semiquantification of bacteria was performed by obtaining a series of chromatograms using serial 10-fold dilution of PCR-amplified DNA extracted from dental plaque samples. The assay time was less than 3 h. The semiquantification procedure revealed the relative amounts of each test species in dental plaque samples, indicating that this disposable device has great potential in analysis of microbial composition in the oral cavity and intestinal tract, as well as in point-of-care diagnosis of microbiota-associated diseases.

## 審査結果要旨

齲蝕、歯周病、口臭に代表される細菌性口腔疾患は、コッホの古典的病原細菌とは異なり、特定の細菌によって起こるのでなく、複数の細菌や細菌群のバランスが乱れることによって生ずることが明らかになってきた。それに伴い、細菌性口腔疾患のリスク診断としての細菌検査は、口腔バイオフィーム中に存在する特定の細菌を対象とするのではなく、複数の細菌、すなわち細菌叢を解析する必要性に迫られている。近年、研究レベルでは、網羅的培養法やメタゲノム解析法の発展によって細菌叢の解析は可能となってきたが、臨床の現場で使用するには、いずれもコストや解析時間の問題から、未だ難しいのが現状である。

本研究は、その隘路を解消するために、口腔バイオフィーム細菌叢を構成する複数の細菌種を、「PCR法による細菌 DNA の増幅」と「Dipstick DNA クロマトグラフィー」を組み合わせた全く新しい手法を用いて、迅速、高感度かつ一斉に検出することを試みたものである。結果として、細菌特異的プローブ・タグの設計上の制限があるものの、試料採取から解析結果取得に至るまで数時間で完結する高感度解析法を開発することに成功している。本法では、PCR 装置以外は特別な機器を必要とせず、解析結果も容易に肉眼で判別できることから、コストの大幅な削減と臨床現場での汎用性の獲得を実現した。さらに、段階希釈した試料を用いることで定量性が得られ、これまでの定量性 PCR 法に代わる、簡便な細菌定量法となる可能性を示している。

本研究によって、これまで必要とされながら、コストや解析時間の問題から臨床現場での応用が困難であった、口腔バイオフィーム細菌叢のプロファイリングが可能になるものと思われる。さらに本手法は、口腔バイオフィーム細菌叢の解析はもちろんのこと、腸内細菌叢など他のヒト細菌叢や、土壌細菌叢など他の環境細菌叢の分析にも応用することが可能であり、今後、細菌叢分析法の一つとして広く使用されることが期待される。

以上のことから、本論文は博士（歯学）の学位に値するものと判断する。