

【目的】妊婦が歯周病に罹患していると、歯周病菌が子宮内の炎症性サイトカイン濃度を上昇させ、早産や低体重児出生を誘発する危険性が高まることが分かっている。歯周病ケアを基盤とした早産・低体重児出生の予防策を講じるためには、歯周病と妊娠を取り巻く実態を明らかにする必要がある。これまで報告されてきた研究では、歯周ポケットの深さや出血指数などの指標を用いて歯周病の“進行度”を評価することが主流であった。しかし、妊婦の歯周病罹患やその重症度が早産や低体重児出生の発生と有意に関連していない研究結果が散見されることも報告されている。そこで、早産・低体重児出生予防を目的とした口腔ケアの効果的な介入方法を見出すためには、異なる視点から歯周病と妊娠異常との関連性を探る必要がある。中国やルワンダでは、歯周病の原因であり同時に妊娠異常を誘発する根源でもある“歯周病菌”に着目し、妊婦口腔内の歯周病菌量が出産時の妊娠週数や出生児体重にもたらす量的影響の分析に取り組みられてきた。しかしながら、歯周病菌の病原遺伝子の遺伝子型が妊娠結果にもたらす質的影響はこれまで評価されてこなかった。本研究では歯周病菌の病原遺伝子に着目し、その塩基配列から遺伝子型分類を行う。重度歯周病との関連が深い *Porphyromonas gingivalis* において、どの遺伝子型がより早産や低体重児出生を誘発するリスクが高いのか明らかにし、歯周病菌の『高リスク型』を探索することを目的とした。

【方法】妊婦 153 名の唾液検体のうち、出産後の追跡調査データ（妊娠週数、出生時体重）が得られており、*Porphyromonas gingivalis* が検出された 94 名の検体を本研究での最終対象者とした。3つの病原性遺伝子 (*RgpA*, *RgpB*, *Kgp*) の全配列を決定するため、それぞれの遺伝子領域を分割してシーケンス解析が可能なプライマーセットを ApE A plasmid editor を用いて設計した。実際に各配列領域の増幅を目的とした PCR を行い、目的のバンドの切り出しや PCR 産物精製を経てサンガーシーケンスを両側から行った。

【結果】*RgpA* 遺伝子領域 (5,121 nt) を 6 分割、*RgpB* 遺伝子領域を 3 分割 (2,211 nt)、*Kgp* 遺伝子領域 (5,172 nt) を 6 分割して全配列をカバーするプライマーセットを設計した。それぞれのプライマーセットによる PCR で Positive Control (ATCC 株) で目的のバンドサイズが確認され、Negative Control (RNase free water) でもすべて陰性となった。この検出系を用いてサンプルの PCR を行ったが、*RgpA* で 1 プライマーセット、*RgpB* で 1 プライマーセット、*Kgp* で 2 プライマーセットにおける PCR 産物の電気泳動で、複数のバンドが確認された。サンプル中には様々な細菌が含まれていることから、*P. gingivalis* に非特異的な PCR 産物が生じている可能性があった。そこで、ゲルから目的のバンドサイズを切り出して DNA を抽出し、サンガーシーケンスを行って配列データを取得した。PCR 条件の検討やゲルの切り出し等に時間を要し、本助成期間中には配列データを取得する段階まで終了した。

#### プライマーの設計と PCR 産物生成及びサンガーシーケンスの流れ

