

論文審査の結果の要旨

氏名：古市 嘉秀

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Isolation and identification methods for *Solobacterium moorei* involved in halitosis

（口臭と関連する *Solobacterium moorei* の分離・同定法の確立）

審査委員：（主査） 教授 落合 智子

（副査） 教授 小方 頼昌

教授 福本 雅彦

本研究は、菌血症、敗血症、難治性根尖性歯周炎、限局性侵襲性歯周炎、口臭との関連が報告されているグラム陽性嫌気性菌の *Solobacterium moorei* (*S. moorei*) を検出・分離するための選択培地の開発、有用な同定方法の確立、口腔における本菌の分布の解析、*S. moorei* 量のモニタリングが口臭症診断の臨床指標として有用か否か、さらには *in vitro* において *S. moorei* の volatile sulfur compounds (VSCs) 産生能をガスクロマトグラフにより定量し、代表的な口腔細菌の VSCs 産生能と比較・検討を行ったものである。

口臭とは、本人または第三者が不快と感じる呼気の総称である。真性口臭症、仮性口臭症、口臭恐怖症に分類できる。さらに真性口臭症は、社会的容認限度を超える明らかに口臭が認められる生理的口臭と、何らかの疾患が原因で発生する病的口臭に分類される。近年、グラム陽性嫌気性菌の *S. moorei* が、口臭を有さない被験者（口臭健常者）と比較して、口臭症患者から有意に検出されるために、本菌と口臭との関連性を示唆する報告が多くなされている。しかしながら、*S. moorei* が正常口腔細菌叢の一部であるか否か、そして本細菌の詳細な口腔内分布も未だ不明のままである。また、その表現型性状の違いにより、*S. moorei* の分離は困難を極める。さらに、現在 *S. moorei* の同定・検出方法は、16S rRNA 遺伝子シーケンス解析、broad-range PCR 法、DNA プローブ法が用いられているが、コスト面、煩雑性、時間を要するといった問題がある。そのため、菌血症、敗血症、歯周炎と同様に、口臭とも関連する *S. moorei* の口腔における詳細な分布を調査するために、適した選択培地と簡便かつ信頼性の高い同定方法が必要と考えられる。

Tryptic soy agar にビタミン K₁ (10 mg/L)、ヘミン (5 mg/L)、L-システイン (800 mg/L)、0.5% yeast extract (5 g/L)、羊血液 (50 ml/L) を添加した CDC 血液寒天培地を基礎培地とした。この基礎培地に *S. moorei* が感受性を示さなかったカナマイシン (50 mg/L)、シノキサシン (100 mg/L)、エリスロマイシン (30 mg/L)、コリスチン (20 mg/L) を添加したものを選択培地とし、本選択培地を SoloSM と命名した。*S. moorei* を SoloSM に接種・塗抹・培養を行うと、やや白色がかかった透明な円形のスムーズコロニーを形成し、その大きさは 1.0 mm 程度であった。SoloSM 上で、*S. moorei* は特徴的な集落外観を呈するために、本菌を容易に識別することが可能であった。CDC 血液寒天培地と比較して、SoloSM は *S. moorei* の全ての供試菌株において平均 98.3% と高い回収率を示した。さらに、SoloSM は *S. moorei* 以外の代表的な供試菌の発育を顕著に抑制した。そのため、今回開発した SoloSM の選択性は優れていることが示された。

また、本研究では *S. moorei* を迅速かつ正確に同定・検出することが可能な PCR 法の確立を試みた。本研究で開発した PCR 法による *S. moorei* の同定と検出方法は、DNA 抽出作業が不要であり、試料採取から結果が得られるまでに要する時間は 2 時間以内で検出可能であるために簡易性に優れ、高精度かつ迅速に結果が得られる有用な手法であると考えられた。

開発した *S. moorei* 選択培地 (SoloSM) を用いて、口臭健常者 20 名と口臭症患者 20 名から採取した舌背試料における *S. moorei* の検出頻度を調査した。口臭健常者と口臭症患者の呼気をセンサーガスクロマトグラフ (ODSA-P3-A) を用いて測定した総 VSC 量は、それぞれ 64.8 ppb と 750.9 ppb であった。健常者と口臭症者の全ての被験者から *S. moorei* は検出された。口臭健常者と口臭症患者における *S. moorei* 数は、 5.0×10^4 CFU/ml (幅: 8.2×10^3 - 7.6×10^4) と 2.9×10^6 CFU/ml (幅: 5.9×10^5 - 4.4×10^6) で、口臭健常者よりも口臭症患者において有意に多く認められた ($P < 0.01$)。 *in vitro* において、*S. moorei* と代表的な口腔細菌の VSCs 産生量をガスクロマトグラフにより定量した結果、*S. moorei* が最も高い VSC 濃度を示し、*Fusobacterium nucleatum*,

Porphyromonas gingivalis がその後続いた。以上のことから、*S. moorei* 量をモニタリングすることは真性口臭症の診断に有用な臨床指標となり得ることが推察された。

本研究では、ヒト口腔から *S. moorei* を分離するための SoloSM と称した選択培地を開発した。SoloSM は高い選択性を有するために、ヒト口腔の様々な部位における本菌の分布と役割を調査するのに有用であると考えられた。*S. moorei* の分離と同定のために、本研究で開発した選択培地 (SoloSM) と PCR 法は、本菌によって引き起こされる菌血症、敗血症、難治性根尖性歯周炎、限局性侵襲性歯周炎、さらには口臭症などの迅速診断に貢献することが示唆された。

本研究は、*S. moorei* 量のモニタリングが口臭診断の臨床指標として大いに有用であることを証明したものであり、口臭の予防・治療の指標の発展に寄与するものである。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和2年3月19日