

論文審査の結果の要旨

氏名：井山 禎之

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Detection, isolation, and identification methods for *Scardovia wiggisiae* and its involvement in adult dental caries

（*Scardovia wiggisiae* の検出・分離・同定法の確立と成人う蝕との関連性）

審査委員：（主 査） 教授 落合 智子
（副 査） 教授 福本 雅彦
教授 有川 量崇

本研究は、重度幼児期う蝕（Severe ECC）と強い相関を認める *Scardovia wiggisiae*（*S. wiggisiae*）を歯垢試料から高精度、かつ同時に分離・定量可能な選択培地を開発し、両菌種の分離・定量法の確立を行ったものである。

哺乳瓶う蝕とも呼ばれる乳歯う蝕の重度幼児期う蝕（Severe ECC）は、急速に進行して乳歯の壊滅的な破壊を引き起こす。また、Severe ECC罹患児らの半分以上に治療直後に新たなう蝕罹患を認めるため、患児における完璧なう蝕治療の達成を困難にさせる。さらに、Severe-ECCは永久歯う蝕のリスク因子ともなる。

*Streptococcus mutans*は、高い酸産生能および耐酸性能を有するために、Severe ECCの主要な原因であると考えられてきた。しかしながら、近年の研究報告では、*S. mutans*がSevere ECC患者の多くで検出されるが、全患者において本菌が検出されるわけではないために、*S. mutans*以外の細菌がSevere ECCの原因となることが示唆された。その後、Severe ECCに関与する特定細菌を解析したTannerらは、ミュータンス連鎖球菌よりもグラム陽性嫌気性菌の*Scardovia wiggisiae*（*S. wiggisiae*）がSevere ECCと強い相関を認めたと報告している。しかしながら、今までに成人う蝕と本菌との関連性を調査した詳細な研究報告はなく、また*S. wiggisiae*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。さらに、その表現型や性状の違いにより、*S. wiggisiae*の分離は非常に困難を極める。加えて、現在用いられている*S. wiggisiae*の同定・検出方法は、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、重度幼児期う蝕と関連する*S. wiggisiae*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される。そこで本研究の目的は、*S. wiggisiae*を検出・分離するための選択培地を開発すること、有用な同定方法を確立すること、口腔における本菌の分布を解析すること、また本菌と成人う蝕との関連性を調査することであった。

BHI (37 g/L) に 0.5 % yeast extract (5 g/L)、寒天 (15 g/L) を添加した BHI-Y 寒天培地を基礎培地とした。この基礎培地に galactose (10 g/L) と bromocresol purple (17 mg/L)、さらに *S. wiggisiae* が感受性を示さなかった ofloxacin (13 mg/L)、fosfomycin (13 mg/L)、cinoxacin (40 mg/L)、gentamicin (7 mg/L)、aztreonam (13 mg/L)、amphotericin B (5 mg/L) を添加したものを選択培地とし、本選択培地を SWSM と命名した。*S. wiggisiae* を SWSM に接種・塗抹・培養を行うと、黄色のラフコロニーを形成し、その大きさは約 1.1 mm 程度であった。SWSM には、galactose と pH 指示薬である bromocresol purple が添加されており、接種した選択培地上に *S. wiggisiae* が存在すれば、本菌が培地上で発育・増殖する過程で、培地成分のガラクトースを分解して酸を産生することによって培地 pH の低下が生じ、コロニー色が紫から黄色へと変化することで、本菌を容易に識別できるように工夫を施した。そのため、*S. wiggisiae* は SWSM 上で、特徴的な集落外観と黄色コロニーを呈するために本菌を容易に検出することが可能となった。BHI-Y 寒天培地と比較して、SWSM は *S. wiggisiae* の全ての供試菌株において、平均 96.9% と高い回収率を示した。さらに、SWSM は *S. wiggisiae* 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 SWSM 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. wiggsiae* 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. wiggsiae* 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。

カリエスフリー群 (CF) 30 名、低-中等度カリエスを有する群 (LMD) 20 名、及び多数歯カリエスを有する群 (HD) 20 名から歯垢試料を採取し、開発した *S. wiggsiae* 選択培地 SWSM に接種・培養を行って、各群における *S. wiggsiae* の検出頻度を調査した。各群の平均 DMFT は CF 群が 0, LMD 群が 2.7, HD 群が 11.2 であった。各群において *S. wiggsiae* が検出された者は、CF 群が 4 名 (13.3%), LMD 群が 2 名 (10.0%), HD 群が 20 名全員 (100%) であった。また、CF 群、LMD 群、HD 群における総細菌数に対する *S. wiggsiae* の比率は、CF 群で 0.0002%, LMD 群で 0.0012%, HD 群で 0.1120% であり、HD 群における *S. wiggsiae* の比率が他群と比較して有意に高かった ($p<0.05$)。そのため、本菌は成人う蝕、特に多数歯カリエスと関連性があることが示唆された。

以上のことから下記の結論を得た。

1. 本研究において開発した *S. wiggsiae* 選択培地 (SWSM) は、優れた選択性と高い回収率を示したことから、ヒト口腔より本菌種を分離するために有用であるものと判断された。
2. 本研究で確立した Multiplex PCR 法により *S. wiggsiae* の同定・検出方法は簡易性に優れ、高精度かつ迅速な結果が得られる有用な手法であることが推察された。

本研究は、本菌が関与する成人う蝕や Severe ECC の診断に貢献する上で、基礎的知見を提供し、将来の臨床医学の礎となることが大いに期待されるものである。

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 3 年 1 月 21 日