

論文の内容の要旨

氏名：小野 喜徳

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Novel isolation and identification methods for *Veillonella* species involved in halitosis

（口臭と関連する *Veillonella* 属菌の新しい分離・同定法の確立）

人々の口臭に対する関心は、近年著しく高まってきている。口臭の発生は口腔、特に舌背で生息している細菌が産生する硫黄化合物などの代謝産物が主原因となる。口腔 *Veillonella* 属菌は偏性嫌気性グラム陰性球菌で、高い硫化水素産生能を有するために口臭と関連する主要な細菌の一つと見なされている。本属菌の分離には、Rogosa が開発した *Veillonella* 選択培地（VSM）が今日まで世界中で汎用されてきた。しかしながら、VSM 上で良好な発育を示さない菌種が複数認められるため、選択培地の改良がこれまで望まれていた。

そこで本研究は、全ての口腔 *Veillonella* 属菌種を分離可能な新しい選択培地の開発を目的とした。また、Multiplex PCR 法による口腔 *Veillonella* 属菌 6 菌種を対象とした簡易かつ有用な同定法の確立も試みた。さらに、本属菌と口臭との関連性を詳細に調査した。

本研究では、口腔から分離される *Veillonella* 属菌 6 菌種（*V. atypica*, *V. denticariosi*, *V. dispar*, *V. parvula*, *V. rogosae*, *V. tobetsuensis*）を対象とした。まず基礎培地の検討を行い、続いてディスク拡散法を用いて抗菌薬感受性試験を行った。その後、全菌種が最も良好な発育を示した培地を基礎培地とし、本菌が感受性を示さない抗菌薬を添加することにより、口腔 *Veillonella* 属菌を対象とした新たな選択培地（OVSM）の開発を行った。選択培地に用いる基礎培地を検討した結果、Tryptic soy agar に羊血液と乳酸ナトリウムを添加した培地上で *Veillonella* 属菌が最も良好に発育したため、これを基礎培地とした。また、抗菌薬感受性試験の結果、vancomycin と oxacillin に対して *Veillonella* 属菌が非感受性を示したために、基礎培地にこれらの抗菌薬を添加したものを選択培地とし、本選択培地を OVSM と命名した。口腔 *Veillonella* 属菌が良好な発育を示す基礎培地と比較した VSM と OVSM における口腔 *Veillonella* 属菌の認定株と分離株の回収率を調査したところ、OVSM の回収率は平均 98.4%と全ての菌株において良好な発育を示したのに対し、既存の選択培地 VSM では全ての口腔 *Veillonella* 属菌株の著しい発育抑制を認めた。

次に、Multiplex PCR 法に用いる菌種特異的プライマーは、DNA Date Bank of Japan (DDBJ)から得られた *dnaK*, *gltA* 及び *rpoB* 遺伝子の配列に基づいて設計した。予想される増幅サイズは、*V. atypica* が 93bp, *V. tobetsuensis* が 197bp, *V. rogosae* が 318bp, *V. parvula* が 397bp, *V. dispar* が 516bp, *V. denticariosi* が 607bp であった。口腔 *Veillonella* 属菌 6 菌種は各々該当するサイズに増幅物を認めたが、*Veillonella* 属菌以外の代表的な口腔細菌では増幅物を認めなかった。本 Multiplex PCR 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。

また、口臭症群（n=50）および口臭健常群（n=50）から舌背試料を採取し、本研究で開発した OVSM と数種の代表的な口腔細菌用の選択培地を用いることにより、両群における *Veillonella* 属菌と代表的な口腔細菌の検出・分布状況を比較検討した。さらに、*Veillonella* 属菌株と代表的な口腔細菌株を個々に培養し、それらが産生する揮発性硫黄化合物（VSC）量の測定も行った。口臭健常者と口臭症者の選別は、総 VSC 量 200ppb 未満は口臭健常者とし、総 VSC 量 200ppb を超えた場合は口臭症者とした。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 65.8 ± 41.8 ppb と 772.3 ± 376 ppb であった。口臭健常者と口臭症者の全被験者から *Veillonella* 属菌が検出された。また、口臭健常者と口臭症者の舌背試料における *Veillonella* 属菌数は、 $3.97 \pm 4.08 \times 10^7$ CFU/ml と $2.58 \pm 1.85 \times 10^7$ CFU/ml で口臭健常者と比較して口臭症者において有意に多く検出された ($p < 0.01$)。さらに、口臭症者の舌背細菌叢の特徴は、総細菌数に占める偏性嫌気性菌の割合が高く (53.6%)、その中でも *Veillonella* 属菌が顕著に増加 (27.2%) していることが判明した。一方で、口腔優勢菌である *Streptococcus* 属、歯周病原菌である *Fusobacterium* 属菌、*Porphyromonas* 属菌および *Prevotella* 属菌は、両群間で有意差は認められなかった。口臭健常群と口臭症群における口腔 *Veillonella* 属菌 6 菌種の検出状況を比較したところ、*V. rogosae* は全ての被験者から検出されたのに対し、*V. denticariosi* と *V. parvula* の検出者数は少ない傾向を示した。*in vitro* 実験において、代表的な口腔細菌 26 菌株が産生した VSC 量を測定したところ、*Fusobacterium nucleatum* が最も高い VSC 産生能を示し、次いで *Porphyromonas gingivalis*、*Prevotella* 属菌が続いた。その後に *Veillonella* 属菌 6 菌種が続く結果となった。

以上のことから、本研究で開発した OVSM と Multiplex PCR 法は、高い選択性と特異性を有するため、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。また、*Veillonella* 属菌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示唆された。