

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09580

研究課題名(和文) 唾液中硫化水素が歯周炎の病態形成に与える影響の解明

研究課題名(英文) Role of salivary hydrogen sulfide in the pathogenesis of periodontitis

研究代表者

中島 啓介 (Nakashima, Keisuke)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80227785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯周治療前後で硫化水素(呼気および唾液)および唾液中の生物学的マーカーを測定し歯周組織検査との関連を調べ、歯周炎の病態形成に与える硫化水素の影響を検討した。患者サンプルについて簡易ガスクロマトグラフィーと蛍光プローブを利用して硫化水素を測定する予定であったが、2020年当初に発生したCOVID-19感染症の影響により患者からのサンプル採取を断念した。1時間毎に申請者自身からサンプル採取し測定した結果、呼気中の硫化水素のピークは50-150 ppbと変動しメチルメルカプタンとジメチルサルファイドはいずれも20-30 ppbであった。残念ながら、唾液中の硫化水素は低濃度のため測定できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、歯周基本治療前後で呼気中のVSCおよび唾液中の生物学的マーカーを測定し歯周組織検査値との関連を明らかにすることで、歯周炎の病態形成に与える硫化水素の影響を解明することであった。歯周基本治療前後で硫化水素(呼気および唾液)および唾液中の生物学的マーカー(炎症、酸化ストレス、細胞傷害)を測定し歯周組織検査値との関連を調べることで、将来、歯周治療における治療方針決定のための指針を作成できる可能性を想定していた。しかし、COVID-19感染症の影響により外来患者からのサンプル採取を断念せざるを得なかったため、本来得られる有益な情報は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：Aim of the study was to clarify the involvement of hydrogen sulfide in chronic periodontitis by measuring the level of hydrogen sulfide (in expiration and saliva), biological markers in saliva and clinical parameters of periodontal tissue before and after periodontal treatment. We had a plan to measure hydrogen sulfide in patient samples using simple gas chromatography and fluorescent probe. However, we gave up the sample collection from a patient due to the COVID-19 infectious disease occurred at the beginning of 2020. As a result of measuring samples obtained hourly from the applicant, the peak of the hydrogen sulfide exhaling fluctuated with 50-150 ppb, and methyl mercaptan and a dimethyl sulfide were all 20-30 ppb. Unfortunately, the concentration of hydrogen sulfide in saliva was too low to measure with the fluorescent probe.

研究分野：歯周病学

キーワード：硫化水素 唾液 口臭 歯周炎

## 1. 研究開始当初の背景

硫化水素 ( $\text{H}_2\text{S}$ ) は共有結合性の水素化合物で、密度は空気を 1 とすると 1.190 であり空気よりも重い。有毒ガスとしての毒性としては、化学的な反応性の高さによる皮膚粘膜への刺激性、ミトコンドリアに所在するシトクロム c オキシダーゼの阻害が挙げられる。1989 年に哺乳類の脳に内在性の硫化水素が存在することが報告されてからは、生理活性物質として注目されるようになった。現在までに、抗炎症、インスリン分泌調節、血管新生、酸素センサー、小胞体ストレス調節、NF- $\kappa$ B 調節を介した抗アポトーシス作用等が報告されている。歯科領域では古くから口臭の臭気成分として盛んに研究が行われている。

口臭とは、呼気中に感じられる悪臭の総称である。呼気中の臭気成分としては、エタノール、メタノール、アセトンなどの有臭物質や蛋白分解産物であるアミン、インドール、硫化物などが検出されてきた。現在は、3 つの VSC (硫化水素、メチルメルカプタン、ジメチルスルフィド) が主要な臭気成分であると考えられている。これらの VSC は、硫黄分子に水素分子あるいはメチル基が 2 つ結合した類似の構造を持つ ( $\text{H-S-H}$ ,  $\text{H}_3\text{C-S-H}$ ,  $\text{H}_3\text{C-S-CH}_3$ )。

口臭の主な発生源は口腔内であるが、口腔と連続している鼻腔、咽頭とそれに続く食道、喉頭とそれに続く気管支、等に発生する疾患によっても影響を受ける。歯面、歯周ポケットおよび舌背では、口腔内細菌由来のタンパク分解酵素により脱落上皮細胞、連鎖球菌、ブドウ球菌、多形核白血球などが分解される。分解により生じた硫黄を含むアミノ酸 (システイン、メチオニン) が口腔細菌によって代謝され、硫化水素、メチルメルカプタンが産生される。さらに、メチルメルカプタンからジメチルスルフィドが二次的に生成される。

口臭と歯周炎の関連については、60 年以上も前から研究されている (Morita, M., Wang, H. L.: Association between oral malodor and adult periodontitis: a review. J Clin Periodontol 28(9): 813-819, 2001)。初期の研究で「歯周病患者から採取した唾液が健常者の唾液より早く腐敗する」という結果が得られたため、それ以降、数多くの研究が行われ、1) 歯周炎患者の呼気中には VSC が多く含まれる、2) 深い歯周ポケットから採取した GCF には VSC が多く含まれる、3) 歯肉縁下プラーク中の細菌は VSC を産生する、4) 硫化水素およびメチルメルカプタンは歯肉上皮、歯肉線維芽細胞、多形核白血球に傷害を与える、等の結果が得られている。近年、細胞内で産生される低濃度の硫化水素について、1) 歯周炎患者の歯肉組織に硫化水素を産生する酵素が認められる、2) ヒト歯根膜幹細胞においてこの酵素活性を阻害すると細胞増殖、細胞分化が抑制される、等の結果が報告され、歯周炎の病態形成におけるその役割が注目されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周基本治療前後で呼気中の VSC および唾液中の生物学的マーカーを測定し歯周組織検査値との関連を明らかにすることで、歯周炎の病態形成に与える硫化水素の影響を解明することである。歯周基本治療前後で硫化水素 (呼気および唾液) および唾液中の生物学的マーカー (炎症、酸化ストレス、細胞傷害) を測定し歯周組織検査値との関連を明らかにすることで、歯周炎の病態形成に与える硫化水素の影響を解明する。また、臨床的な改善度も評価す

ることから、将来、歯周治療における治療方針決定のためのツールとなる可能性もある。

### 3. 研究の方法

#### (1) 被験者の選択

九州歯科大学附属病院歯周病科を受診した慢性歯周炎患者のうち、以下の条件に該当する患者 30 名程度を被験者とする。1) 1 年以内に歯周治療を受けていない、2) 20 本以上の残存歯が存在し、6 点法の計測でプロービング深さ 4 mm 以上の部位が 40%以上存在する、3) 全身疾患（慢性鼻炎、気管支炎、胃潰瘍、肝炎、糖尿病等）に罹患していない、4) 禁煙状態が 1 年以上続いている（喫煙歴があっても可）。被験者に対しては研究内容を十分に説明し、書面による承諾が得られることを本研究への参加条件とする。

#### (2) 研究スケジュール

初診時に、治療の一環として行っている歯周組織検査（6 点法による歯周ポケット深さ、プロービング時出血の有無、歯の動揺度、O' Leary のプラークコントロールレコード）を行う。検査結果から上記の条件に適合すると判定された場合には、研究内容について口頭と書面により説明し書面による承諾を得る。2 回目の来院時にはまず、呼気と唾液を採取し、その後口腔清掃指導を始めとする歯周基本治療を開始する。数回の治療を経た後、歯周基本治療後の再評価を行う。再評価の実施日には呼気と唾液を採取した後、歯周組織検査を行う。

#### (3) 呼気の採取と測定

呼気の測定には、簡易ガスクロマトグラフィー（オーラルクロマ CHM-2、エフアイエス株式会社）を使用する。製品に付属のシリンジを被験者に渡して、マニュアルに従い被験者から呼気を採取する。シリンジ内のガスをオーラルクロマ CHM-2 に呼気を注入すると、約 4 分後に硫化水素、メチルメルカプタン、ジメチルスルフィドの濃度が表示される。

#### (4) 唾液の採取と測定

被験者に Saliva Collection Aid を装着した 2 ml クライオバイアル（サリメトリックス社）を口唇で咥えさせ、60 秒間、流涎により安静時唾液を採取する。採取した唾液は、直ちに $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存する。

##### ①硫化水素の測定

唾液中の硫化水素濃度は、蛍光プローブ HSip-1（同仁化学研究所）を利用してマイクロプレートリーダーで測定する。

##### ②生物学的マーカーの測定

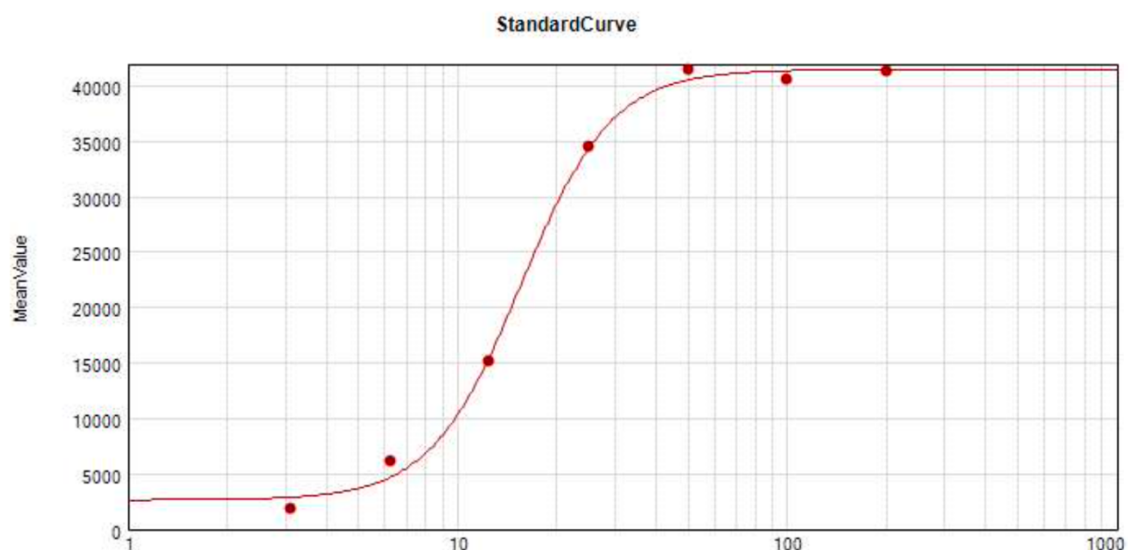
測定は市販のプレートリーダー用キットを使って行う。炎症マーカーとして、C 反応タンパク、IL-1 $\beta$ 、IL-6、トランスフェリン（サリメトリックス社製 ELISA キット）、酸化ストレスマーカーとして、グルタチオン、酸化型グルタチオン（同仁化学研究所製キット）、細胞傷害マーカーとして乳酸脱水素酵素（バイオアッセイシステムス社製キット）、システイン（プロフォルディンプロテインフォールディングサービス社製キット）を各々測定する。

### 4. 研究成果

研究期間は当初、平成 30 年度（2018 年度）から 3 年間で、2019 年末には購入予定の測定機

器が全て揃ったことから患者からの呼気と唾液の採取を開始する予定であった。

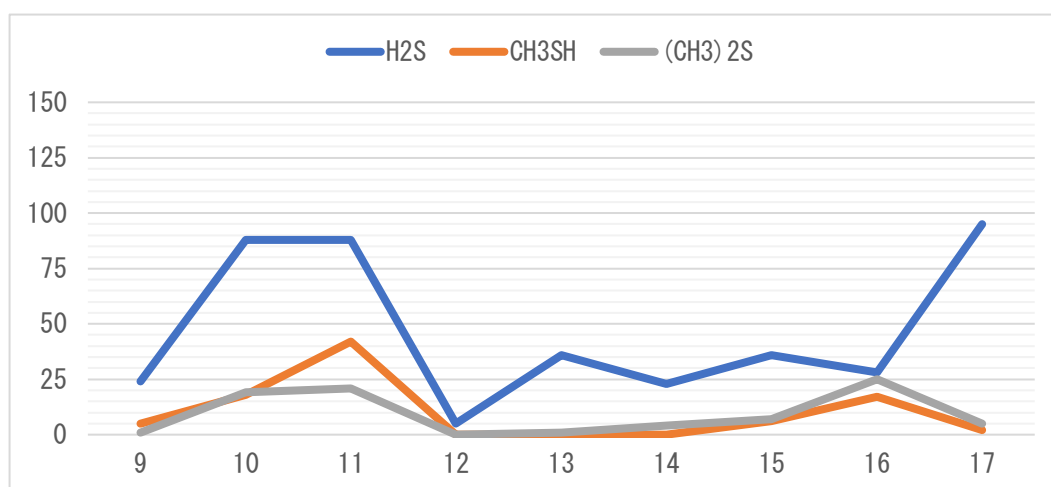
2020年当初に COVID-19 感染症が発生し、予定していた患者からのサンプル採取が困難になったため、蛍光プローブ HSip-1 を使った硫化水素測定の準備を行った。200  $\mu$ M の  $\text{Na}_2\text{S}$  水溶液を連続 2 倍希釈して調整した標準水溶液を作成し、励起波長 491 nm，蛍光波長 516 nm で蛍光強度を測定した。この結果、50  $\mu$ M 以上で蛍光強度はピークに達することが明らかになった。よって、それ以降は 100  $\mu$ M の  $\text{Na}_2\text{S}$  水溶液を連続 2 倍希釈して標準水溶液を調整すること



にした。

2021年度と2022年度の2年間、研究期間の延長を申請したが、重症感染者数のピークは現在の8波まで続いており収束の兆しは一向に認められない。唾液中には高濃度の COVID-19 ウイルスが存在すること、ワクチンの優先接種を受けた歯科医師にも感染例が多く認められること考慮し、感染防止の観点から患者および医局員からのサンプル採取を断念した。

よって、申請者自身から一定時間おきに呼気および唾液を採取し、硫化水素濃度を測定することにした。同日の9時から17時まで1時間毎に呼気と唾液を採取した。



同様のサンプル採取を 5 回行った結果、メチルメルカプタンとジメチルサルファイドはいずれも午前中に最高で 30 ppb まで増加し、昼食後に検出されなくなるが 17 時頃まで徐々に増加する傾向であった。硫化水素については昼食後に低下する傾向は認められたが、採取日によってピークが 50-150 ppb と変動していた。これらの唾液サンプルの硫化水素濃度を測定したが、いずれのサンプルも標準曲線の信頼域より低い蛍光強度しか示さなかったことから測定不能であった。中等度から重度の歯周炎患者では、呼気中にもう少し高濃度の硫化水素が含有されていると考えられる。今後、COVID-19 感染症が収束すれば再度、同時に採取した呼気サンプルおよび唾液サンプル中の硫化水素の測定を試みる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kasai Shingo, Onizuka Satoru, Katagiri Sayaka, Nakamura Taiji, Hanatani Tomoya, Kudo Takahiro, Sugata Yuou, Ishimatsu Michie, Usui Michihiko, Nakashima Keisuke	4. 巻 62
2. 論文標題 Associations of cytokine levels in gingival crevicular fluid of mobile teeth with clinical improvement after initial periodontal treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 189 ~ 196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.19-0056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 分 担 者	臼井 通彦  (Usui Michihiko)  (10453630)	九州歯科大学・歯学部・准教授    (27102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関