

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目: 若手研究(B)

研究期間: 2007~2008 年度

課題番号: 19791636

研究課題名(和文)フゾバクテリウム特異的な唾液 sIgA 抗体が舌苔の成熟に及ぼす影響

研究課題名(英文) The role of anti *Fusobacterium nucleatum* salivary sIgA antibody for accumulation of tongue coating.

研究代表者 福井 誠 (FUKUI MAKOTO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号: 50325289

## 研究成果の概要:

本研究では、舌苔中および唾液中の *F. nucleatum* (Fn) 菌数、唾液中の総 sIgA 濃度と抗 Fn sIgA 抗体価の測定を行い、舌苔の形成における Fn の関与と抗 Fn sIgA 抗体の役割を検討した。また、唾液中のストレスマーカーであるコルチゾール濃度、および T 細胞サイトカインの唾液中濃度も測定することで、口臭による精神的ストレスが、sIgA 産生や口腔内の Fn の存在に対しておおよそ影響について検討した。その結果、舌苔スコアが高い者ほど、唾液 sIgA 濃度が高く、舌苔中 Fn 菌数が多い者では抗 Fn sIgA 抗体価が高くなる傾向が示された。また、口臭に対する不安はコルチゾールの分泌を促進し、Th2 サイトカイン優位な状態にする可能性が示唆されたが、唾液 sIgA の産生や、抗 Fn sIgA 抗体価に影響を与えているとは言えなかった。

## 交付額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	0	2,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 歯学・社会系歯学

キーワード: 唾液, 口臭, 舌苔, *Fusobacterium nucleatum*, 唾液 IgA

## 1. 研究開始当初の背景

近年、衛生意識の向上により、人々の口臭への関心が高まっている。口臭の原因物質として最も重要なものは、硫化水素、メチルメ

ルカプタン、ジメチルサルファイドなどの揮発性硫黄化合物(VSC)であり、これらの物質は主として口腔内において嫌気性細菌がシステインやメチオニンを代謝する時に産生することが知られている。嫌気性細菌は病的歯周ポ



ケットにおいて増加し、歯周病原性に深く関与しているが、舌苔にも多数存在することが最近の研究で明らかにされつつある。舌苔はプラークと同様のバイオフィームであり、口腔内の微生物や剥離した上皮、白血球、リンパ球などが停滞し、定着してでき、口臭の主要な発生源のひとつとして注目されている。

舌苔の形成過程は、プラークと同様に、*Streptococcus*属を中心とした通性嫌気性菌が早期に定着し、その後、舌苔が成熟するに従い後期定着細菌として偏性嫌気性菌である*Fusobacterium*属、*Porphyromonas*属、*Prevotella*属などが構成細菌に加わる。この偏性嫌気性菌が口臭原因物質の産生の主因となる。歯周病原性細菌の一つである*Fusobacterium nucleatum*は、酪酸やVSCなどの口臭原因物質を産生する。また、早期定着細菌および後期定着細菌の両方に対する菌体表層レセプターを持ち、菌体間凝集の中心となる細菌であり、舌苔の成熟過程においての中心的な役割を演じている存在と考えられている。

一方唾液は、その分泌量の低下が口臭発生と密接に関連していることが知られているものの、唾液成分の質的な違いと口臭発生との関係についてはほとんど何も調べられていない。唾液中には種々の生理活性物質が存在するが、その中の分泌型IgA(sIgA)は、細菌を凝集することにより口腔表面への定着を阻止し、排除に関わっている。しかしながら、舌苔形成あるいは口臭と唾液中のsIgAとの関連性を調べた報告はほとんど無く、そこで、今回申請者は、*F. nucleatum*に特異的な唾液sIgA抗体に注目し、舌苔成熟に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした研究を行うこととした。

## 2. 研究の目的

唾液は口腔の局所免疫を担う重要な物質であり、唾液中の分泌型IgA(sIgA)は口臭の主要な発生源である舌苔に生息する細菌に対してとりわけ大きな影響を与える可能性が考えられる。歯周病原性細菌の一つである*Fusobacterium nucleatum*は早期定着細菌および後期定着細菌の両方に対する菌体表層レセプターを持ち、菌体間凝集の中心となる細菌であることから、舌苔の形成過程において中心的な役割を演じると考えられている。本研究では、舌苔中および唾液中の総細菌数と*F. nucleatum*数、唾液中の総sIgA濃度と抗*F. nucleatum*sIgA抗体価の測定を行い、舌苔の形成における*F. nucleatum*の関与と抗*F. nucleatum*sIgA抗体の役割を検討した。また、sIgA産生は精神的ストレスによって影響を受けると考えられているので、唾液中のストレスマーカーとして知られているコルチゾール濃度、およびコルチゾールによる制御を受けsIgA産生に関与しているT細胞サイトカインの唾液中濃度も測定することで、口臭による精神的ストレスは、sIgA産生や口腔内の*F. nucleatum*の存在に対して、どのような影響をおよぼす可能性があるのかを検討した。

## 3. 研究の方法

### (1)舌苔の形成における*F. nucleatum*の関与と唾液抗*F. nucleatum*sIgA抗体の役割

徳島大学病院口臭外来を受診した25名(平均年齢51.3歳、男性9名、女性16名)を軽度舌苔付着群(小島の舌苔スコア0, 1, 2の者)および重度舌苔付着群(舌苔スコア3および4の者)の2群に分類した。呼気中のVSC濃度はガスクロマトグラフィーで測定した。被験者の舌苔は、舌背部をプラスチックパーテルにて3回擦過することで採取し、リン酸緩衝液(PBS)1mlに懸濁した。唾液は、5分間の安静時唾液を、吐出法にて採取した。唾液中sIgA濃度と抗*F. nucleatum*IgA抗体価はELISA法にて測定した。唾液中および舌苔中の総細菌数と*F. nucleatum*菌数は、リアルタイム定量PCR法により測定した。

### (2)口臭に対するストレス刺激の唾液sIgA産生および*F. nucleatum*に対する影響

徳島大学病院口臭外来を受診した40名(平均年齢40.8歳、男性11名、女性29名)に、プラスチック製臭い袋を用いた官能検査を行った。6段階の官能検査スコアで評価し、官能検査スコア2以上の者(社会的容認限度を超える口臭を有する)を真性口臭症群、官能検査スコア0および1の者(問題となるような口臭を有しない)を心因性口臭症群(仮性口臭症および口臭恐怖症)と分類した。口臭症患者を、Cornell Medical Index健康調査票を使用して、深町の基準に従い、CMI領域IとIIの者を正常域者、領域IIIとIVの者を神経症傾向者と分類した。全ての口臭症患者と口臭の訴えのないボランティア被験者21名(平均年齢39.4歳、男性5名、女性16名)から5分間の安静時唾液を、吐出法にて採取した。そして唾液中のsIgA濃度と抗*F. nucleatum*IgA抗体価およびコルチゾールの濃度はELISA法を用いて測定した。T細胞サイトカインはIL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-13, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$ の濃度を、バイオプレックスサスペンションアレイシステムを用いて測定した。

## 4. 研究成果

### (1)舌苔の形成における*F. nucleatum*の関与と抗*F. nucleatum*sIgA抗体の役割

重度舌苔付着群では唾液sIgA濃度は軽度舌苔付着群に比べて有意に高い値を示した(図1)。また、舌苔中の総細菌数と唾液sIgA濃度は統計学的に有意ではないものの、正相関の傾向がみられた(図2)。また、舌苔中の総細菌数と舌苔スコアの間には有意な正相関が見られた(図3)。唾液抗*F. nucleatum*sIgA抗体価と、舌苔中の*F. nucleatum*菌数との間には有意ではないものの、正相関の傾向がみられた(図4)。本研究の結果では、舌苔スコアが高い者ほど、唾液sIgA濃度が高いことが示された。また、抗*F. nucleatum*sIgA抗体価を調べたところ、舌苔中*F. nucleatum*菌数が多い者では抗*F. nucleatum*sIgA抗体価が高くなる傾向が示された。これは、成熟した舌苔から*F. nucleatum*が口腔内へ供給されることによって、*F. nucleatum*特異的なsIgA抗体の産生が誘導されたと考えられる。唾液中sIgAは口腔内環境において主要な免疫グロ



プリンであり、特に細菌に付着し凝集させることにより、病原性細菌の粘膜への付着を防ぐと言われている。一方、成熟した舌苔はバイオフィルム様の形態を取っているため、特異的 sIgA 抗体が産生されても、*F. nucleatum* のような舌苔深部に存在するグラム陰性嫌気性菌を排除する力はないのかもしれない。このことから舌苔が多く付着した者では、唾液 sIgA 濃度が高く、構成細菌に対する抗体価が高くても、それだけでは舌苔中の口腔細菌の排除が十分に行えないので、物理的な舌苔の除去が必要と考えられる。ただ、本研究では舌苔の採取は舌背部を3回擦過することにより得たものであり、舌苔を可及的に採取したものではなかった。そのため、ごく一部の舌苔のみが採取され、測定に使用された可能性があり、必ずしも舌苔の全体の状態を反映しているとは言えない。今後の研究では、全ての舌苔を採取するようにして、それを分析に供する必要がある。

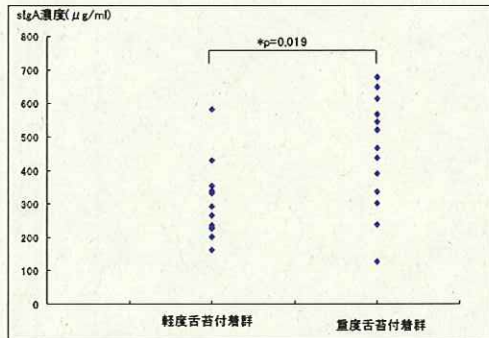


図1. 軽度舌苔付着群と重度舌苔付着群での唾液 sIgA 濃度の比較  
\*: Mann-Whitney U 検定による。  
重度舌苔付着群では唾液 sIgA 濃度は軽度舌苔付着群に比べて有意に高い値を示した。

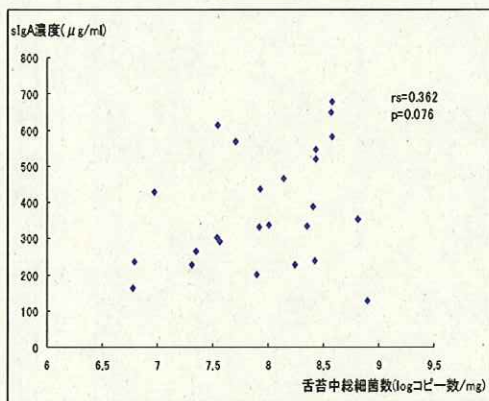


図2. 舌苔中総細菌数と唾液 sIgA 濃度の相関  
rs: Spearman 順位相関係数  
舌苔中の総細菌数と唾液 sIgA 濃度は統計学的に有意ではないものの、正相関の傾向がみられた。

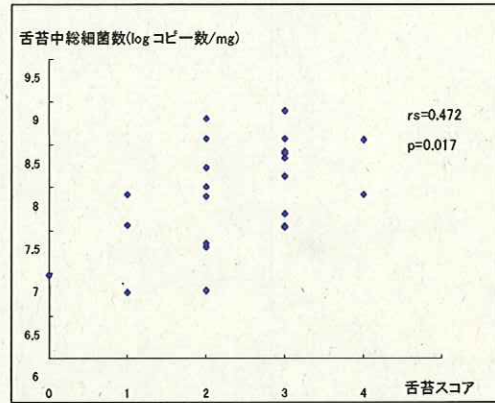


図3. 舌苔中総細菌数と舌苔スコアの相関  
rs: Spearman 順位相関係数  
舌苔中の総細菌数と舌苔スコアの間には有意な正相関が見られた。

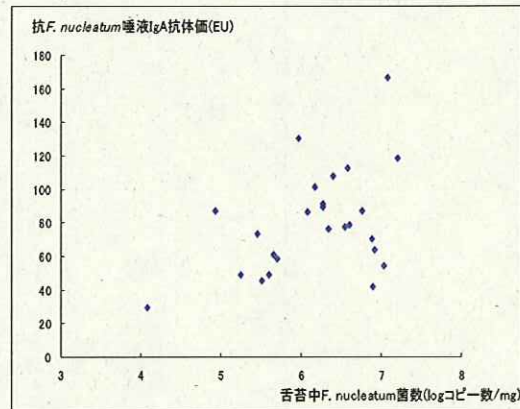


図4. 舌苔中 *F. nucleatum* 菌数と唾液抗 *F. nucleatum* sIgA 抗体価の相関  
rs: Spearman 順位相関係数  
唾液抗 *F. nucleatum* sIgA 抗体価と、舌苔中の *F. nucleatum* 菌数との間には統計学的に有意ではないものの、正相関の傾向がみられた。

(2)口臭に対するストレス刺激の唾液 sIgA 産生および *F. nucleatum* に対する影響  
唾液中のコルチゾールレベルについて、心因性口臭症群では、そうでない者に比べて有意に高いことが示された(図5)。また、Th1/Th2 サイトカインについて、多くの被験者で、測定限界以下のものがあつたため、測定限界値以上を示した者を陽性とし、コルチゾールレベルが高く神経症傾向にある者(高ストレス群: 8名)とコルチゾールレベルが低く精神的に正常域にある者(低ストレス群: 17名)で、Th1/Th2 サイトカイン陽性者の比率を比較したところ、高ストレス群では IL-5 陽性者の率が有意に高いことが示された(表1)。sIgA 濃度と抗 *F. nucleatum* sIgA 抗体価については、高ストレス群と低ストレス群の間で違いは見られなかった。以上の結果から、口臭に対する不安はコルチゾールの



分泌を促進し、Th1/Th2 サイトカインバランスに影響を与え、Th2 サイトカイン優位な状態にする可能性が示唆されたが、そのことが唾液 sIgA の産生や、抗 *F. nucleatum* sIgA 抗体価に影響を与えているとは言えなかった。今後は、日常生活における口臭以外の慢性的な精神的ストレスを考慮に入れた、さらなる検討が必要であると考えられる。

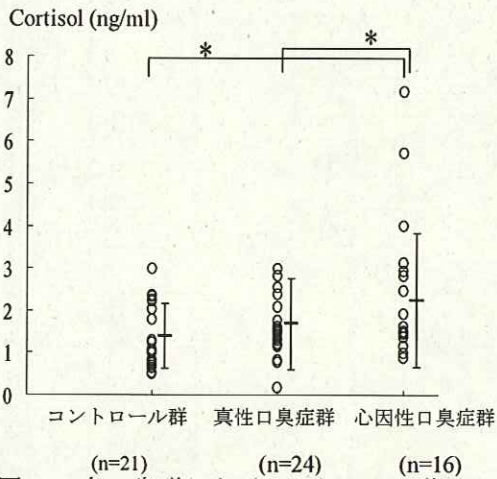


図5. 各口臭群およびコントロール群間の唾液コルチゾール濃度の比較  
 バーは平均値 ± S.D.を表す。  
 \* : ボンフェローニの修正による Mann-Whitney U 検定により有意差あり (p<0.05)。  
 唾液中のコルチゾールレベルについて、心因性口臭症群では、そうでない者に比べて有意に高いことが示された。

表1. ストレス状態と Th1/Th2 サイトカインとの関連性

cytokines		Number of subjects		p value <sup>s</sup>
		Cort Low CMI Low	Cort High CMI High	
IL-2	positive <sup>a)</sup>	4	5	0.075
	negative	13	3	
IL-12p70	positive	5	2	0.607
	negative	12	6	
GM-CSF	positive	11	4	0.393
	negative	6	4	
IFN- $\gamma$	positive	4	2	0.756
	negative	13	6	
TNF- $\alpha$	upper <sup>b)</sup>	7	3	0.607
	lower	10	5	
IL-4	positive	2	4	0.059
	negative	15	4	
IL-5	positive	4	6	0.022
	negative	13	2	
IL-10	positive	4	3	0.884
	negative	13	5	
IL-13	positive	1	2	0.231
	negative	16	6	

単位:人

\$\chi^2\$ 検定による。

a) positive: 唾液サイトカインレベルが、測定限界下限よりも高い値を示したものの。

b) upper: 唾液 TNF- $\alpha$  レベルが 50 パーセントイル値よりも高い値を示したものの。コルチゾールレベルが高く神経症傾向にある者 (高ストレス群) とコルチゾールレベルが低く神経症傾向にない者 (低ストレス群) で Th1/Th2 サイトカイン陽性者の比率を比較したところ、IL-5 が高ストレス群で有意に陽性者の率が高いことが示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. 福井 誠: 口臭症と唾液生理活性物質の関連性, 四国歯学会誌, 21 (1) 129~141, 2008. 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

1. Fukui M., Baatarjav T., Kataoka K., Hinode D. and Ito H.-O.: Salivary cortisol and Th1/Th2 cytokines of patients with complaint of halitosis. 第 56 回国際歯科研究学会(JADR)日本部会総会・学術大会 (2008 年 11 月 29~30 日 名古屋市).

2. 福井 誠, 片岡 宏介, 伊藤 博夫: 健康者の唾液中におけるサイトカインレベルの総合的分析, 第 57 回日本口腔衛生学会総会 (2008 年 10 月 2~4 日大宮市).

3. 片岡 宏介, 関根 伸一, 福井 誠, 金川 裕子, Tselmeg Baatarjav, 伊藤 博夫: 粘膜アジュバント・コレラ毒素の経鼻投与は唾液腺 B1-B 細胞の IgA クラススイッチングを誘導する, 第 57 回日本口腔衛生学会総会 (2008 年 10 月 2~4 日大宮市).

4. 片岡 宏介, 関根 伸一, 東江 正裕, 田中 宗雄, 福井 誠, 伊藤 博夫, 雲石 聡: 金属特異的結合唾液タンパク質の同定, 第 19 回日本口腔衛生学会近畿・中国・四国地方会総会 (2008 年 6 月 22 日 徳島市).

5. Makoto Fukui, Daisuke Hinode, Masaaki Yokoyama, Masami Yoshiok, Tselmeg Baatarjav and Hiro-O Ito: Analysis of mental stress against oral malodor and salivary substances. 第 55 回国際歯科研究学会(JADR)日本部会総会・学術大



会 (2007年11月17~18日, 横浜市) .

6. 福井 誠, 日野出 大輔, 横山 正明, 吉岡 昌美, 伊藤 博夫: 口臭患者における唾液ストレスマーカーの評価, 第56回日本口腔衛生学会総会 (2007年10月3~5日, 東京都) .

7. Daisuke Hinode, Makoto Fukui, Masaaki Yokoyama, Masami Yoshioka. : Cognition of own tongue coating by patients complaining of oral malodor. 7th International Conference of the International Society for Breath Odor Research (Chicago, U.S.A.) August 22-24, 2007.

8. 横山 正明, 福井 誠, 本那 智昭, 高松 夏子, 増田 かなめ, 伊藤 博夫: 口腔清潔度の指標としての唾液中総細菌数-リアルタイム PCR 法によるハイスループット測定-, 第18回日本口腔衛生学近畿・中国・四国地方会総会 (2007年6月17日, 大阪市).

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

研究代表者 福井 誠 (FUKUI MAKOTO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
研究者番号 : 50325289