

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791645

研究課題名 (和文) 口臭に関連する口腔細菌叢の多様性解析

研究課題名 (英文) Study of microbial communities in oral malodor

研究代表者

谷口 奈央 (TANIGUCHI NAO)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60372885

研究成果の概要：口臭に関係する口腔フローラを見いだす目的で、分子生物学的手法を用いて口腔内細菌叢の多様性解析を行い、得られた細菌叢パターンと口臭の主要な原因物質である揮発性硫黄化合物の濃度との関係を比較分析した。また、我が国の成人の半数以上が感染しておりさまざまな胃腸疾患を引き起こす *Helicobacter pylori* DNA の口腔内検出と口臭との関連について調べた。さらに、心理テストを利用して口臭患者の心身医学的症状を整理し、生活習慣では飲酒習慣と口臭レベルの正の相関をみいだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

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：口臭・口腔細菌叢・揮発性硫黄化合物 (volatile sulfur compound, VSC)・歯周病原細菌・*Helicobacter pylori*・PCR・T-RFLP

1. 研究開始当初の背景

我が国において、国民の 14.5%が口臭問題を訴えており (厚生省「保健福祉動向調査」, 平成 11 年度実施)、口臭は重要な口腔疾患のひとつだと考えられる。口臭の原因や治療法の研究は進歩しているが、口臭発生のメカニズムについては依然として不明な点が多い。エビデンスに基づいた検査・診断および治療のために、口臭発生のメカニズムをより明らかにする必要がある。

口臭に含まれる悪臭ガスは約 20 種類同定

されており、なかでも揮発性硫黄化合物 (volatile sulfur compounds, VSCs) は口臭の主要な原因物質として重要とされ、その約 90%を硫化水素、メチルメルカプタンおよび硫化ジメチルが占めるといわれている。VSCs は、口腔内に棲息する嫌気生菌が志向や舌苔に含まれるタンパク成分を分解することによって発生すると考えられており、有力な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* が硫化水素やメチルメルカプタンを産生す

ることが明らかとなっている。

申請者は口臭クリニックの患者について、口臭の強さと歯周病原細菌の分離頻度について研究している。その結果、歯周病原細菌が口臭発生に関与していることは明らかとなったが (Yoneda et al, J Oral Sci, 2006; 鈴木他, 日歯周誌 春季特別号, 2006)、舌苔や歯周病が顕著に口臭発生のリスク要因であるのに比較すると、特定の細菌の種類や菌数の口臭に対する影響力は弱かった (鈴木他, 日歯周誌 秋季特別号, 2006)。たとえば唾液中の *P. gingivalis* と口臭測定値との相関関係を調べたところ、PCR による検出頻度は官能評価値と有意な相関を示したが (図 1, $p < 0.01$)、定量分析ではほとんど相関がみられなかった。一方、*Prevotella spp.* や *Tannerella forsythia* は検出頻度では官能評価値と相関を示さなかったが、菌数では中等度の相関を示した ($p < 0.05$)。また、硫化水素やメチルメルカプタンと官能評価値との相関は中等度であり、口臭には歯周病細菌以外の細菌が産生する物質も関与している可能性も示唆された。さらに、唾液中の全細菌数の増加に伴い官能評価値が減少したことから ($p = 0.068$)、口臭を減らす「善玉菌」の存在の可能性も考えられた。

2. 研究の目的

これまでの研究経過から、口臭発生は特定の VSCs 産生菌や細菌数だけで説明できるものでなく、約 700 種の微生物が棲息できると推測される口腔内環境で、細菌叢のバランスや変化が大きく関与しており、既知の微生物に対する解析だけで実態を把握することは難しいと思われる。したがって、口臭を総合的に評価するためには、口腔細菌叢全体を把握する必要があると考える。そこで、遺伝子の共通配列を利用して特定の遺伝子領域を増幅・分析することで、これまで培養されていない菌種も含めて口臭に関与する口腔細菌叢を網羅的に解析し、口臭発生のメカニズムを明らかにすることを計画した。

本研究では、従来の定性分析および定量分析に加えて、T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 法を用いて口腔細菌叢の多様性解析を行い、さまざまな口臭の症状と口腔細菌種との関連を調べる。本法は、片方の末端を蛍光標識したプライマーセットを用いて遺伝子の共通配列を PCR 増幅した後、制限酵素を用いて切断し、DNA シークエンサーを用いてフラグメント解析をおこなうもので、蛍光標識された菌種に特異的なフラグメント (T-RF) を検出し、T-RF ピークの位置や強度、数により、細菌叢を評価・比較する断片多型性分析技法である (参考文献; Nakano Y et al., Bioinformatics 22:1788-1789, 2006)。データベースに基づい

て菌を同定し菌量を相対的に評価できる特徴を利用して、口臭ガス発生源と考えられる口腔微生物を網羅的に解析する。得られた口腔細菌叢パターンと臨床的な口腔内所見、官能評価値および VSCs 測定値とを比較することにより、口臭の有力な原因菌を明らかにする。また、官能評価値と VSCs 測定値に違いがみられるサンプルを解析することによって VSCs 以外の口臭ガスを産生する菌を同定することができる。重要と思われる菌については分離培養して悪臭ガスの産生能について解析をおこなう。さらに、口臭のある群とない群あるいは改善前と後を比較することにより、口臭発生を減少させる「善玉菌」の発見が期待できる。これらの研究成果により、口臭の原因が解明されれば口臭の治療薬の開発にもつながり、さらなる研究の発展が期待される。また、本研究では、通常のお臭測定値および口腔内診査に併せて、性別、年齢、生活習慣、全身的既往、服用薬物、ストレス因子、精神的自覚症状なども分析対象としてデータを蓄積し、口腔細菌叢パターンで口臭を分類する、新しい口臭診断法を開発する。口腔細菌叢パターンを用いた診断法は、口臭に限らず歯周病や齲蝕のリスク診断や予防治療にも応用できると考えられる。

また口臭問題は、患者の精神問題と深い関係があることが知られており、口臭レベルと精神状態の関連性を整理することが診断の上で重要となる。本研究では、問診や CMI 健康調査表 (Cornell Medical Index-Health Questionnaire) を利用して、口臭レベルと患者の心身学的特性について分析をおこなう。

3. 研究の方法

平成 19 年度

1. T-RFLP法を用いた口腔細菌叢の多様性解析

1) 対象者

分析対象者は、福岡歯科大学医科歯科総合病院口臭クリニックの受診患者のうち、本人から細菌検査をおこなうことに際してインフォームドコンセントの得られた 150 名とする。クリニックには年間約 200 名の受診患者があるため、本研究の遂行に問題はない。本研究を含む一連の口臭に関する臨床研究は研究対象者への人権擁護上の配慮、インフォームドコンセントを必要とするため、既に福岡歯科大学・福岡医療短期大学倫理委員会による審査を受け、承認されている (「口臭に関与する細菌叢についての臨床研究」, 許可番号 89 号)。

2) 口臭測定と検査項目

口臭の測定は、官能検査、ハリメーターを用いた総 VSCs 量、ガスクロマトグラフィーを用いた各 VSC の濃度測定とする。口腔内の検査項目は、歯式、歯周組織診査、刺激唾液流

出量、唾液潜血試験、舌苔の厚みと広さ、舌苔の色調とする。唾液潜血試験にはペリオスクリーン (サンスター) を用いる。全身疾患と服用中の薬剤については問診にて情報を得る。生活習慣については、質問票に記入してもらう。喫煙習慣のほか、食事の回数、口腔清掃状況、睡眠時間などを含む。臨床診断は宮崎ら (新潟歯誌, 29:11-15, 1999) の示した治療必要性を考慮した国際分類に従う。また、心身両面にわたる自覚症状については、CMI健康調査表を利用して評価する。

3) 試料と分析方法

(i) 試料の採取

唾液試料はガムテストを用いて、5分間の刺激唾液を採取する。

(ii) DNAの抽出

採取した臨床試料のDNA抽出は、ガラスビーズ衝撃を利用した物理的破砕法を用いておこなう。つまり、高速遠心にて回収したペレットにcell lysis bufferを加えて熱処理した後、サンプルにジルコニウムビーズとタングステンビーズを混ぜ合わせて破砕する。フェノール・クロロホルム処理をした後、エタノール沈殿をおこなって細菌のDNAを調製する。

(iii) 口腔細菌叢の多様性解析

抽出したDNAを用いて、T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 解析をおこなう。T-RFLPでは未知の細菌やまだ培養されていない細菌を含めて網羅的に解析することが可能である。官能評価値が高いのにVSCs測定値が低い群では、VSCs以外の悪臭ガスを産生している可能性のある菌を同定する。VSCs測定値が高いのに可能評価値が低い群では、口臭を減らす「善玉菌」である可能性のある菌をみいだす。口臭のある群とない群、改善前と後の口腔細菌叢パターンを比較解析することによって、口臭に関係深い菌種をみいだす。

平成20年度

2. 口臭発生メカニズム解明

T-RFLP解析の結果、口臭への関与が疑われる菌種で培養可能なものについては、リアルタイムPCRを用いて定量解析をおこない、絶対的菌数の変化を調べる。主要な口腔細菌のリアルタイムPCR解析についてはすでに確立し報告している。培養できる細菌であれば定量解析は可能である。また口臭への関与が疑われる未知のT-RFピークを認めた場合には、対象試料について16S rRNAクローンライブラリーを作製してクローン解析をおこなう。さらに、重要と思われる菌種については、分離培養を試みてガス産生能について解析をお

こない、口臭発生のメカニズムをより明らかにする。

3. T-RFLP法を用いた新しい口臭診断法の開発

蓄積されたデータで口臭患者を口腔細菌叢パターンで分類し、さまざまなパラメータを加えて解析をおこない、T-RFLP法を用いた新しい口臭診断法を確立する。

4. 口臭と精神状態の関係についての解析

口臭測定値と口腔内所見、生活習慣、問診票ならびにCMI健康調査表の結果から、口臭レベルと患者の心身学的特性の関係を分析する。

4. 研究成果

1. 口腔細菌叢の多様性解析

130名の口臭患者と61名のボランティア計191名について、刺激唾液より調製した細菌DNAを鋳型とし、分子生物学的手法 (terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP) を用いて口腔細菌叢の多様性を調べた。同時にガスクロマトグラフィーを用いて口臭の主要な原因ガスである揮発性硫黄化合物 (volatile sulfur compound, VSC) の濃度を測定した。その結果、被験者は口腔内の細菌叢パターンに基づいて3グループに分類でき、グループ間でVSC全体や各VSC濃度に有意差が認められた。さらに、口臭の影響因子とされる口腔内臨床所見との関連を調べたところ、5 mm以上の歯周ポケットを有する頻度が、細菌叢パターングループ間で有意に異なっていた。一方、唾液流出量や舌苔付着量には差が見られなかった。これまでの成果から、口臭に関連する口腔細菌叢パターンの存在が示唆された。

続いて、口臭の原因となる歯周ポケット、舌苔付着、刺激唾液量に問題のない130名の患者とボランティアについて、同様に細菌叢の解析をおこなった。T-RFLPによって得られた細菌叢パターンで3グループのうち、あるパターンを有するグループはほかの2つのグループに比較して、VSCレベルが高いことがわかった。このように、口臭の原因となる臨床所見がない場合のVSCレベルの個人差には、細菌叢のパターンの違いである可能性が示唆された。現在、治療前後の口臭レベルと細菌叢の変化を調べている。

2. 唾液中の *Helicobacter pylori* のDNA陽性と口臭との関連性について

*Helicobacter pylori*は胃腸粘膜疾患との深い関連性を知られる菌である。同菌は口腔内で検出されることもあり、口腔内における*H. pylori*の存在は、再感染や感染の入り口として重要とされ、また歯周病や口臭との関連も注

目されている。そこで、口腔内の*H. pylori*感染と口臭の関連性を検討するために、口臭患者362名の唾液サンプルについて16S rRNA遺伝子を利用したPCR解析を行った。その結果、*H. pylori*陽性は21名(6.4%)、陰性は305名(93.6%)であった。陽性群は陰性群に比べて、唾液潜血、動揺度、歯周ポケット、歯周病原細菌の検出などの歯周病パラメータにおいて統計学的に高い値を示した。次に、両群の口臭パラメータを比較したところ、メチルメルカプタンにおいて陽性群が有意に高かった。口臭患者における口腔の*H. pylori*感染の報告は本研究が初めてであり、*H. pylori*は進行した歯周病環境下にて多く検出され、代表的な歯周病原細菌と同時検出されることがわかった。さらに、舌苔因子を取り除いた解析により、*H. pylori*の口腔感染は歯周病を介して間接的に口臭に関係していることが示唆された。今後は、*H. pylori*の胃感染と口腔内感染との関連性を明らかにしている必要がある。

3. 口臭と生活習慣、精神状態に関する研究
口臭発生におけるストレスや生活環境の影響を検討するために、初診時の口臭問診票とCMI健康調査表の回答結果を解析し、精神状態と実際の口臭レベルとの関連性を調べた。口臭問診票の解析より、口臭レベルの低い患者では、他人からの指摘でなく自分で口臭に気づいたと答える割合が高く、対人関係に問題を抱えているとの回答が多かった。CMI健康調査票の解析では、口臭レベルが低いほど、身体的にも精神的にも自覚症状のスコアが高く、神経症傾向も強いことが明らかになった。生活習慣では、飲酒習慣と強い口臭との間に正の相関があることがわかった。

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 10 件)

- ① N. Suzuki, M. Yoneda, T. Naito, T. Iwamoto, K. Yamada, K. Hisama, I. Okada, T. Hirofuji, The relationship between alcohol consumption and oral malodor, *Int Dent J*, 59, 31-34, 2009、有
- ② T. Naito, K. Miyaki, M. Naito, M. Yoneda, N. Suzuki, T. Hirofuji, and T. Nakayama, Parental smoking and smoking status of Japanese dental hygiene students: a pilot survey at a dental hygiene school in Japan, *Int J Environ Res Public Health*, 6, 321-328, 2009、有
- ③ N. Suzuki, M. Yoneda, T. Naito, T. Iwamoto, Y. Masuo, K. Yamada, K. Hisama, I. Okada, and T. Hirofuji, Detection of

Helicobacter pylori DNA in the saliva of patients complaining of halitosis, *J Med Microbiol*, 57, 1553-1559, 2008、有

- ④ N. Suzuki, M. Yoneda, T. Naito, T. Iwamoto, and T. Hirofuji, Relationship between halitosis and psychological status, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 106, 542-547, 2008、有
- ⑤ 鈴木奈央, 米田雅裕、内藤 徹、吉兼 透、岩元知之、廣藤卓雄、問診票を用いた各種口臭症患者の特性についての解析、*口腔衛生学会雑誌 (Japanese Journal of Dental Health)*, 58, 2-8, 2008、有
- ⑥ 米田雅裕、鈴木奈央、内藤 徹、岩元知之、山田和彦、岡田一三、島野裕一、廣藤卓雄、モチベーションの持続と歯科治療の継続により口臭が消失した症例、*日本歯科保存学雑誌*, 51, 236-245, 2008、有
- ⑦ 峰 真理子、米田雅裕、鈴木奈央、内藤 徹、岡田一三、内田初美、吉兼 透、島野裕一、岩元知之、廣藤卓雄、モチベーションに配慮しながら真性口臭症の治療を行なった症例、*歯周病学会雑誌*, 50, 50-57, 2008、有
- ⑧ 米田雅裕、鈴木奈央、廣藤卓雄、誤嚥性肺炎に関連する口腔内細菌について、8020、7: 106-107, 2008;、有
- ⑨ 鈴木奈央、米田雅裕、内藤 徹、廣藤卓雄、口臭と生活習慣の関連についての検討ー口臭に対する飲酒習慣の影響についてー、*歯科衛生士*, 31: 71-73, 2007、無
- ⑩ 米田雅裕、鈴木奈央、内藤 徹、吉兼 透、羽生真也、廣藤卓雄、客観的口臭測定と受容的医療面接の繰り返しにより口臭恐怖が解消した症例、*日本歯科心身医学会雑誌 (Japanese Journal of Psychosomatic Dentistry)*, 22:23-26, 2007、有

[学会発表] (計 20 件)

- ① N. Suzuki, M. Yoneda, T. Naito, K. Yamada, I. Okada, T. Iwamoto, Y. Masuo, T. Hirofuji, Relationship between oral *Helicobacter pylori* and halitosis, The 10th Scientific Joint Meeting between JSCD and KACD, Nov. 27-29, 2008, Seoul
- ② 榊尾陽介、鈴木奈央、米田雅裕、内藤 徹、岩元知之、山田和彦、岡田一三、廣藤卓雄、*Helicobacter pylori*の口腔内感染と口臭の関連性、第 35 回福岡歯科大学学会総会、平成 20 年 12 月 13 日、福岡市
- ③ 岩元知之、内藤徹、鈴木奈央、米田雅裕、廣藤卓雄、職域における電動ブラシを使用した口腔健康指導による行動変容の評価、第 35 回福岡歯科大学学会総会、平成 20 年 12 月 13 日、福岡市
- ④ 伊藤知之、笹本 実、鈴木奈央、永井 淳、

渡辺 猛、力丸哲也、進藤 剛、竹中 淳、柳澤康二、西田敬司、今泉 亮、坂上竜資、柿タンニン（パンシル®）のメルカプトエタノールに対する *in vitro*での消臭効果、第 35 回福岡歯科大学学会総会、平成 20 年 12 月 13 日、福岡市

⑤ 岩元知之、内藤徹、鈴木奈央、宮木幸一、長谷川尚子、大浦智子、米田雅裕、中山健夫、廣藤卓雄、職域における電動ブラシを使用した口腔健康指導による行動変容の評価、第 128 回日本歯科保存学会秋季学術大会、平成 20 年 11 月 6、7 日、富山市

⑥ 吉兼 透、米田雅裕、阿南 壽、山田和彦、鈴木奈央、内藤徹、岡田一三、岩元知之、栴尾陽介、廣藤卓雄、歯周病原性細菌に対する宿主応答-マウス膿瘍モデルを用いた免疫組織学的検討-、第 128 回日本歯科保存学会秋季学術大会、平成 20 年 11 月 6、7 日、富山市

⑦ 鈴木奈央、米田雅裕、内藤 徹、岡田一三、岩元知平成 20 年 10 月 19 日之、栴尾陽介、廣藤卓雄、*Helicobacter pylori*の口腔内感染に関する研究、第 51 回日本歯周病学会秋季学術大会、平成 20 年 10 月 19 日、四日市市

⑧ 杉山精一、内藤 徹、千ヶ崎乙文、藤木省三、福田健二、加藤 徹、国井一好、森谷良行、征矢 亘、鈴木正臣、田中正大、寺田昌平、安田直美、山口将日、米田雅裕、鈴木奈央、廣藤卓雄、歯科患者における受診パターンがQOL指標に与える影響、第 51 回日本歯周病学会秋季学術大会、平成 20 年 10 月 19 日、四日市市

⑨ 内田初美、米田雅裕、鈴木奈央、峰 真理子、内藤徹、岡田一三、岩元知之、栴尾陽介、廣藤卓雄、誤った口臭除去法により tooth wear (TSL) が進行したと思われる症例、第 51 回日本歯周病学会秋季学術大会、平成 20 年 10 月 19 日、四日市市

⑩ T. Naito, M. Yoneda, N. Suzuki, and T. Hirofujii, Numbers of randomized controlled trials reported in Japanese literature database. Cochrane Colloquium, 3-7 October, 2008, Freiburg

⑪ 鈴木奈央、米田雅裕、内藤 徹、岩元知之、栴尾陽介、廣藤卓雄、口臭患者における *Helicobacter pylori*の検出、第 3 回口鼻臭臨床研究会学術大会、平成 20 年 7 月 26-27 日、札幌市

⑫ T. Takeshita, N. Suzuki, Y. Nakano, M. Yoneda, Y. Shibata, S. Shiota, N. Kamio, T. Hirofujii, and Y. Yamashita, Bacterial composition in saliva correlated with oral malodor., The 86th General Session of the International Association for Dental Research, July 2-5, 2008, Toronto

⑬ 内藤 徹、米田雅裕、鈴木奈央、廣藤卓雄、

歯科医院における治療継続患者と治療中段患者のQOL指標の比較、第 23 回日本歯科心身医学会、平成 20 年 7 月 19、20 日、東京

⑭ 内藤 徹、鈴木奈央、米田雅裕、岩元知之、廣藤卓雄、職域における口腔健康指導による口臭の変化-電動ブラシを使用したランダム化比較試験の概要-、第 128 回日本歯科保存学会春季学術大会、平成 20 年 6 月 5 日、新潟市

⑮ 米田雅裕、鈴木奈央、内藤 徹、岩元知之、山田和彦、岡田一三、島野裕一、廣藤卓雄、モチベーションの持続と歯科治療の継続により口臭が消失した症例、第 128 回日本歯科保存学会春季学術大会、平成 20 年 6 月 5 日、新潟市

⑯ Nao Suzuki, Masahiro Yoneda, Toru Naito, Kazuhiko Yamada, Ichizo Okada, Toru Yoshikane, Shinich Shimano, Tomoyuki Iwamoto, Takao Hirofujii, The relationship between halitosis, living habits and conditions, The 9th Joint-Scientific Meeting between Japanese Society of Conservative Dentistry and Korean Academy of Conservative Dentistry, November 8-9, 2007, Okayama

⑰ 中野善夫、竹下徹、神尾宜昌、柴田幸江、塩田 進、鈴木奈央、米田雅裕、廣藤卓雄、山下喜久相関行列を利用した多サンプル T-RFLP分析結果の「二次元」解析法、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会（合同大会）、平成 19 年 12 月 13 日、横浜市

⑱ 鈴木奈央、米田雅裕、内藤 徹、岩元知之、久間一宏、山田和彦、岡田一三、島野裕一、畑野優子、日高圭太郎、武内哲二、廣藤卓雄、生活習慣と生活環境が口臭に与える影響、第 34 回福岡歯科大学学会総会、平成 19 年 12 月 9 日、福岡市

⑲ 中野善夫、竹下徹、神尾宜昌、柴田幸江、塩田 進、鈴木奈央、米田雅裕、廣藤卓雄、山下喜久、サポートベクターマシンを用いた唾液細菌叢分析に基づく口臭推定法、第 81 回日本細菌学会総会、平成 20 年 3 月 24-26 日、京都

⑳ 鈴木奈央、竹下 徹、米田雅裕、内藤 徹、吉兼 透、岩元知之、廣藤卓雄、口臭に関する口腔内細菌叢の多様性解析、第 50 回秋季日本歯周病学会学術大会、平成 19 年 9 月 21、22 日、東京

〔図書〕（計 2 件）

①【監修】伊藤中【編集】渡辺 勝/長山和枝、クイズう蝕&歯周病の基礎知識 100、別冊歯科衛生士、クインテッセンス株式会社

②【監著】内藤 徹【解説】稲垣幸司、鈴木奈央、新田 浩、村上 慶、米田雅裕、知って

て得した！歯周治療に活かせるエビデンス、
クインテッセンス株式会社

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口奈央 (TANIGUCHI NAO)
福岡歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：60372885

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：