

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463264

研究課題名(和文) 亜鉛イオンの特異的口腔内細菌生育抑制に基づく口臭抑制剤の開発

研究課題名(英文) Mouth washes containing zinc ion to inhibit oral malodor

研究代表者

中野 善夫 (NAKANO, Yoshio)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：80253459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：口臭を亜鉛を含んだ洗口液で抑制するために、どのような口腔内細菌が亜鉛の影響を受けて減るのか、あるいは増えるのかを調べた。同時に、その洗口液の使用を継続すると耐性菌が出てくるのか、さらに、使用を停止するとすぐに元に戻ってしまうのかを実験によって確認した。培養液中に亜鉛を添加することで口腔内細菌の生育にどのような影響を与えるかという実験結果を合わせて、亜鉛洗口によって口臭の原因菌の一部、即ちPorphyromonas、Fusobacterium属細菌が有意に減少すること、また4週間を越えた使用で一部の菌が耐性を獲得すること、使用を停止して4週間ほどでもとの細菌叢に戻るなどが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Zinc ions bind to volatile sulfur compounds, reducing oral malodor, and have effects on several oral microorganisms. This study investigated changes in oral microbiota after treatment with a mouth rinse containing zinc chloride. Bacterial 16S ribosomal RNA genes were amplified from the samples, and their nucleotide sequences were determined using barcoded pyrosequencing analysis. The abundance of Porphyromonas sp., Fusobacterium periodonticum, Gemella haemolysans, Haemophilus parainfluenzae, and Streptococcus gordonii significantly decreased after treatment with zinc chloride. Porphyromonas sp. and Fusobacterium sp. are organisms involved in oral malodor. The abundance of Rothia sp., Actinomyces sp. and Streptococcus sp. significantly increased, and were predominant in the oral microbiota. These results suggest that zinc ions inhibit the growth of specific species including oral malodor-related organisms, without altering the entire bacterial ecology.

研究分野：予防歯科学

キーワード：亜鉛 口臭 口腔内細菌叢

## 1. 研究開始当初の背景

口臭は多くの方が気にしていて、対人関係に支障を来すほど悩むこともあって、さまざまな口臭抑制剤が販売されているが、その多くは原因を除去するのではなく、他の匂いでマスクするものでしかない。その中で亜鉛イオンは実際に呼気中の揮発性硫化物(VSC)の量を減少させると報告されている。それは亜鉛が揮発性硫化物と結合し、口臭原因物質を不揮発化するためだといわれているが、一方、亜鉛イオンが口腔内細菌の生育を阻害するという報告もある。その報告はいくつかの菌を選んで、それに対する亜鉛の影響を調べたもので、他にどのような菌が影響を受けるかは判っていない。

口臭の原因として知られている VSC の発生源はおもに口腔内細菌であることが知られている。揮発性硫化物を産生する口腔内細菌として *Porphyromonas gingivalis* や *Treponema denticola*、*Fusobacterium nucleatum* が報告されている。申請者らはこれまでに *T. denticola* のメチオニン分解酵素、*F. nucleatum* のシステイン分解酵素、*P. gingivalis* のメチオニン分解酵素などの遺伝子を同定し、酵素の解析を報告した。そのとき、これらの酵素活性を亜鉛イオンが直接阻害することはなかった。亜鉛が口臭を長時間抑制すること、また、亜鉛がある種の口腔内細菌の生育を抑制することも知られているが、どのような菌の生育に影響を及ぼすかを広範囲で調べた報告はないし、それらの菌と口臭との関係が明らかにされたこともない。

申請者らは、口腔内細菌の生育が亜鉛イオンの存在によって影響を受け、それによって口臭原因物質の量にも変化が起こるのではないかという仮説を立てた。そこで、亜鉛イオンを含む水で3日間1日3回0.1%塩化亜鉛を含む水で洗口を行い、それが口腔内細菌

叢にどのような影響を与えるのかを解析してみたところ、*Fusobacterium* 属や *Porphyromonas* 属細菌などが減少し、一方で、*Rothia* 属細菌などが増加したことが判り、報告した。そこで、本研究では、1) 亜鉛イオンによって口腔内細菌叢がどのような影響を受けるのか、2) 亜鉛イオンによって生育が抑制される口腔内細菌ではどのような変化が起きているのか、3) 亜鉛イオンによる生育抑制の標的となる因子は他の物質によっても同様の影響をもたらすのか、という3点を明らかにし、その結果に基づいた新たな口臭抑制剤の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

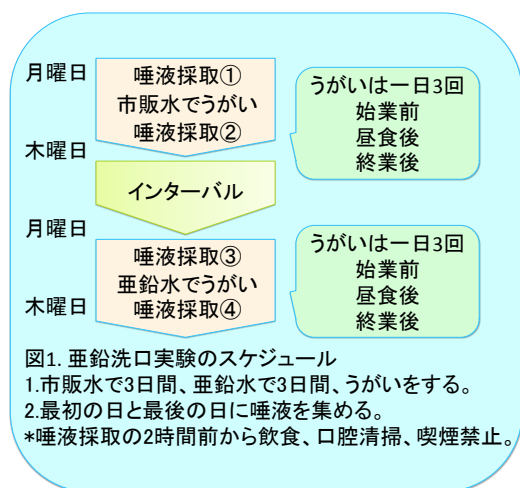
上記の背景とこれまでに得られた研究結果をもとに、本研究では亜鉛イオンによる菌叢変化を数ヶ月にわたって解析すると同時に、抑制される菌種についてはその抑制の程度、さらに影響を受ける因子の分析を行い、亜鉛イオンによる長期的な口臭抑制法の開発を目指す。まず、亜鉛イオンを含む水溶液で洗口し、菌叢の変化を16S rRNA 遺伝子領域を用いた配列解析を行う。短期的(数日間の変化)と長期的(数週間から数ヶ月間)の変化に分けて考える。つぎに、亜鉛イオンにより生育抑制を受ける菌を選び、標準菌株あるいは分離菌株を用いて、どの程度の亜鉛イオン濃度で生育抑制を受けるのかを詳細に調べる。二次元電気泳動を行い、亜鉛イオン存在下で合成の促進されたタンパク、抑制されたタンパクを同定し、どのような影響を受けているかを解析する。

## 3. 研究の方法

### ・ 1週間の洗口実験

福岡歯科大学学部学生 21 名を対象に市販水で3日間、続いて0.1%塩化亜鉛水溶液で3

日間洗口を行った。洗口1日3回、5 mL 液で1分間実施した。洗口開始前日と3日目終業後、3日目 昼食後 洗口から5時間後に、刺激唾液を採取した。唾液より抽出した細菌DNAについて、16S rRNA 遺伝子を利用した高速シーケンス解析法によって細菌構成を決定した。

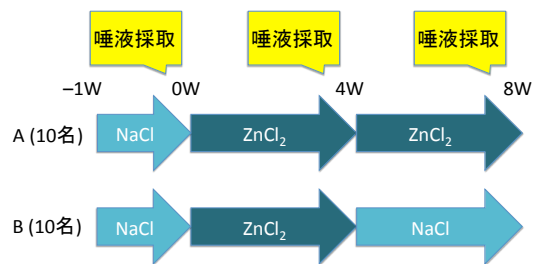


・ 8 週間の洗口実験

本研究は福岡歯科大学・福岡医療短期大学倫理審査委員会により承認を得て実施した(第 233 号)。

福岡医療短期大学 歯科衛生学科の学生ボランティア 20 名(女性、平均年齢 20.4 ± 1.4 歳)を対象とし、無作為に A グループ(10 名)と B グループ(10 名)にわけた。

まず洗口の習慣づけを目的として、両グループともに生理食塩水で一週間洗口をした。続いて、A グループは 0.3% 塩化亜鉛水溶液 5 mL で一日 3 回、8 週間洗口を行った。B グループは、0.3% 塩化亜鉛水溶液 5 mL で一日 3 回、4 週間洗口を行った後、後半 4 週間は生理食塩水で一日 3 回洗口を行った。洗口開始前、4 週後、8 週後に刺激唾液を採取した。図に、スケジュールを示す。



4. 研究成果

・ 短期間(1週間)の洗口実験

次に 20 名の亜鉛洗口前後サンプルを用いて、高速シーケンス解析をおこなった。菌叢が単純化し、常在菌と呼ばれる *Streptococcus salivarius* など *Streptococcus* 属細菌の割合が上がるのがわかった。他に、*Rothia* 属、*Prevotella* 属細菌で上昇がみられた。一方、*Porphyromonas* 属細菌などが減少したが、特定種が特異的に除去されるというほど顕著な変化はみられなかった。塩化亜鉛溶液による継続した洗口によって口腔常在フローラが単純化し、構成する菌種変動が起こることが示唆された。*Porphyromonas* 属細菌は、口臭の原因菌として知られており、亜鉛の口臭抑制効果には揮発性の硫黄化合物との結合によるものだけでなく、口臭原因菌の生育抑制による効果もあることが示唆された。

亜鉛洗口後に割合の増加した菌種 (≥2)	増減率
<i>Campylobacter concisus</i>	17.05
<i>Rothia mucilaginosa</i>	6.34
<i>Streptococcus vestibularis</i>	6.19
<i>Streptococcus cristatus</i>	3.99
<i>Actinomyces sp.</i>	3.97
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	3.71
<i>Streptococcus sanguinis</i>	3.51
<i>Rothia sp.</i>	3.44
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	3.36
<i>Gemella sanguinis</i>	3.16
<i>Neisseria mucosa</i>	3.14
<i>Streptococcus peroris</i>	2.80
TM7 [G-1] sp.	2.79
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.74
<i>Abiotrophia defectiva</i>	2.58
<i>Veillonella parvula</i>	2.40
<i>Prevotella sp.</i>	2.35
<i>Corynebacterium durum</i>	2.18
<i>Streptococcus parasanguinis I</i>	2.09
<i>Streptococcus salivarius</i>	2.05

亜鉛洗口後に割合の増加した菌種 (≥1)	
<i>Streptococcus mitis</i> bv 2	1.96
<i>Streptococcus parasanguinis</i> II	1.93
<i>Granulicatella adiacens</i>	1.80
<i>Prevotella histicola</i>	1.67
<i>Veillonella atypica</i>	1.67
<i>Granulicatella adiacens</i> [para-adiacens]	1.58
<i>Streptococcus oralis</i>	1.37
<i>Streptococcus infantis</i>	1.31
<i>Solobacterium moorei</i>	1.15
<i>Streptococcus</i> sp.	1.15
<i>Streptococcus gordonii</i>	1.06
<i>Streptococcus australis</i>	1.00

亜鉛洗口後に割合の減少した菌種 (1>)	
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	0.93
<i>Neisseria flavescens</i>	0.91
<i>Capnocytophaga</i> sp.	0.91
<i>Gemella haemolysans</i>	0.83
<i>Streptococcus mitis</i>	0.78
<i>Porphyromonas</i> sp.	0.77
<i>Leptotrichia</i> sp.	0.72
<i>Gemella morbillorum</i>	0.70
<i>Terrahaemophilus aromaticivorans</i>	0.47

・ 8 週間の洗口実験

4 週間の 0.3% 塩化亜鉛水溶液による洗口により、*Porphyromonas* 属、*Fusobacterium* 属、*Haemophilus* 属、*Leptotrichia* 属、*Neisseria* 属などが減少し、このうち、*Porphyromonas* 属と *Fusobacterium* 属の細菌は、口臭の原因菌として報告されているものである。

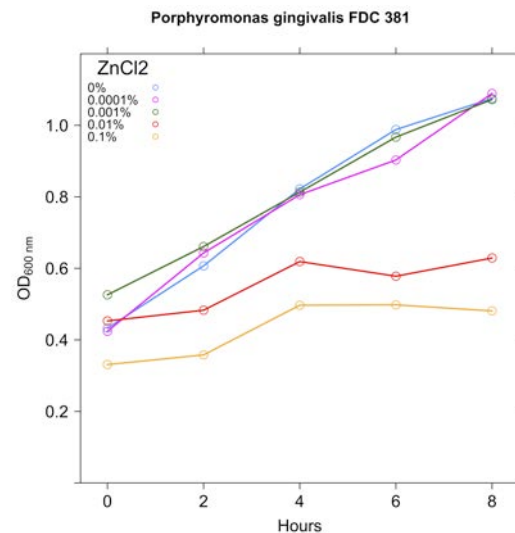
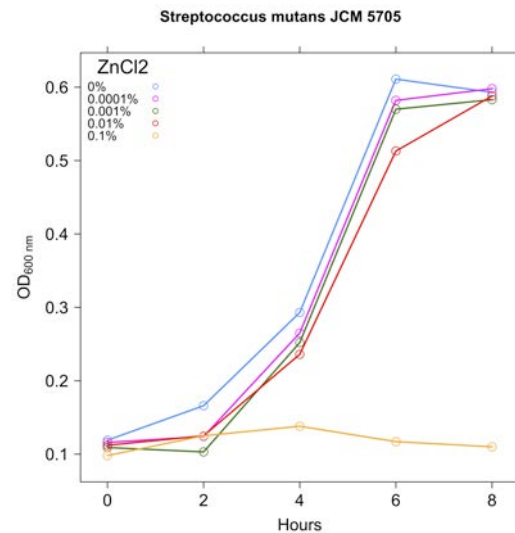
0W vs. 4W	P value
<b>減少した菌種</b>	
<i>Haemophilus</i>	0.0027
<i>Neisseria</i>	0.0061
<i>Gemella</i>	0.0383
<i>Corynebacterium</i>	0.0185
<i>Lautropia</i>	0.0207
<i>Porphyromonas</i>	0.0002
<i>Leptotrichia</i>	0.0006
<i>Alloprevotella</i>	0.0177
<i>Fusobacterium</i>	0.0016
<b>増加した菌種</b>	
<i>Rothia</i>	0.0008
<i>Prevotella</i>	0.0011
<i>Actinomyces</i>	0.0001
<i>Streptococcus</i>	0.0310

8 週間の洗口の後は、占有率の減少した菌種の数が 9 種から 4 種に減った。増加した種の数にも減少が見られた。

0W vs. 8W	P value
<b>減少した菌種</b>	
<i>Haemophilus</i>	0.0098
<i>Leptotrichia</i>	0.0273
<i>Fusobacterium</i>	0.0273
<i>Atopobium</i>	0.0059
<b>増加した菌種</b>	
<i>Rothia</i>	0.0020
<i>Actinomyces</i>	0.0020
<i>Lachnoanaerobaculum</i>	0.0151

また、4 週間の亜鉛水溶液洗口の後、塩化ナトリウム水溶液洗口に変えたグループでは、変動した菌種がほとんどなかった。このことから、洗口水中の亜鉛イオンの効果は、その使用をやめると 4 週間でほぼ消失すること、同時に、長期間の使用により耐性菌が出現することが示唆された。

一方、培養液中に塩化亜鉛を添加することでその生育にどのような影響があるかを、*Streptococcus mutans* と *Porphyromonas gingivalis* で調べたところ、*S. mutans* は塩化亜鉛濃度を 0.1% に上げるまでほとんど影響がなかったのに対し、*P. gingivalis* では、0.01% でも生育が強く阻害された。



この結果は、上の洗口実験の結果とも矛盾しない。

以上のことから、塩化亜鉛による洗口で、種特異的に短期間でその生育を抑制するものの、洗口を停止してからもその効果が継続することはなく、かつ、長期的な使用による耐性菌の出現も見られ、これは長期的な亜鉛水溶液洗口による口臭予防・抑制には揮発性硫化物と亜鉛イオンの結合による効果だけでなく、口臭産生細菌の生育抑制による効果も期待できることが明らかになったが、同時に使用期間を考慮して使う必要があることも示された。

現在、本内容の投稿を準備中である。

#### 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 Y. Nakano, T. Takeshita, N. Kamio, S. Shiota, Y. Shitaba, N. Suzuki, M. Yoneda, T. Hirofujii, and Y. Yamashita. 2014. Supervised machine learning-based prediction of oral malodor based on the microbiota in saliva samples. *Artif. Intell. Med.* 60: 97–101. 査読有. doi:10.1016/j.artmed.2013.12.001

[学会発表] (計 3 件)

- ① 鈴木奈央, 中野善夫, 松尾忠行, 米田雅裕, 廣藤卓雄. ヒト口腔内細菌叢に対する亜鉛イオンの影響, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014. 9. 25~27, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ② 鈴木奈央, 中野善夫, 米田雅裕, 廣藤卓雄. 塩化亜鉛洗口によるヒト口腔内細菌叢の変化と持続性. 第 88 回日本細菌学会総会. 2015. 3. 26~28, 長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市)

- ③ 中野善夫, 桑田文幸, 谷口(鈴木)奈央. n-gram 塩基出現頻度に基づく微生物系統樹解析. 第 38 回日本分子生物学会. 2015. 12. 1~4, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中野 善夫 (NAKANO, Yoshio)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号 : 80253459

##### (2) 研究分担者

谷口 奈央 (TANIGUCHI, Nao)

福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授

研究者番号 : 60372885