

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25862069

研究課題名(和文)口臭産生の新しいメカニズムの確認

研究課題名(英文)Confirm new mechanism of oral malodor

研究代表者

榎尾 陽介(MASUO, YOSUKE)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：40631693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：口臭は口腔内の嫌気性菌によりアミノ酸分解によって産生されると考えられているが、前段階である糖タンパク分解にはグラム陽性菌の  $\beta$ -ガラクトシダーゼが関与していると考えられる。口臭患者より、唾液中の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を定量解析し、本酵素活性は細菌由来のものと考えられ、本酵素は菌体の表面に局在するものと考えられる。生理的口臭ではグラム陽性菌などの常在菌が口臭発生に重要な役割を担うと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Volatile sulfur compounds (VSCs) are produced by proteolysis of periodontopathic bacteria. The proteolysis of glycoproteins depends on the initial removal of the carbohydrate side chains, and  $\beta$ -galactosidase in saliva is considered to play a significant role in that reaction. The aim of the present study was to investigate the localization of  $\beta$ -galactosidase and to evaluate the relationship between this enzyme activity and parameters related to oral malodor.  $\beta$ -galactosidase activity was detected in the pellet lysate and whole saliva, but not in the saliva supernatant: the activity level was the same in the pellet lysate and whole saliva. There was a positive correlation between  $\beta$ -galactosidase activity and total protein in the saliva pellet, although total protein was not related to malodor strength. Our results indicate that  $\beta$ -galactosidase is located on the cell surface of oral bacteria and plays an important role in producing the malodor underlying physiological halitosis.

研究分野：歯科保存学

キーワード：口臭産生のメカニズム  $\beta$ -ガラクトシダーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

口臭は社会生活上の大きな障害となることがあり、口臭を主訴に来院する患者が増加している。われわれはこれまで口臭に関する基礎的、臨床的研究を行い、口臭の原因、増悪因子、精神・社会的背景、治療法、予防法などについて報告してきた。口臭は局所デブリス中のアミノ酸が細菌によって発生し、そのガスの主成分は硫化水素( $H_2S$ )、メチルメルカプタン( $CH_3SH$ )、ジメチルサルファイド( $CH_3SCH_3$ )等のVSCsである。VSCsは *Pprphyromonas gingivalis*、*Treponema denticola*、*Prevotella intermedia*、*Fusobacterium nucleatum* 等の歯周病原性細菌由来のプロテアーゼの働きにより産生される。これらの細菌数と口臭には強い相関があり、歯周疾患を治療することにより口臭の多くは減少する。一方、歯周疾患等口腔内に特に原因はなくても悪臭が発生する生理的口臭がある。主に舌苔から生理的口臭が産生されると考えられているが、歯科治療を行っても劇的に改善しないため一般歯科医は対応に苦慮することがある。この生理的口臭に関与するとして注目されているのがグラム陽性菌の  $\alpha$ -galactosidase である。口臭産生の基質となる主なタンパク質は唾液中のムチンや上皮細胞の成分であり、いずれも多く糖タンパクを有している。そして近年、糖タンパクの糖鎖を舌苔中の主要な細菌である、*Streptococcus salivarius* の  $\alpha$ -galactosidase で切断しておくこと、*P.gingivalis* によるタンパク分解が促進されることが報告された。このように、グラム陽性菌が産生する  $\alpha$ -galactosidase は歯周病原性細菌によるタンパク分解の前段階を促進していると考えられる。また、グラム陽性菌に有効な抗生物質や消毒薬を使用しても口臭が減少することから、 $\alpha$ -galactosidase は口臭産生に重要な役割を果たしていると推測される。われわれは口臭患者の唾液を採取し、 $\alpha$ -galactosidase 活性を有するグループと有しないグループにわけ、口臭の強さ、各種臨床パラメーター、口腔内細菌等との相関関係を調べた (Yoneda et al. *J Breath Res*, 2010)。その結果、 $\alpha$ -galactosidase 活性陽性グループは陰性グループに比べて口臭が強く舌苔の量が多いことが判明した。また、 $\alpha$ -galactosidase 活性は口臭患者の歯周病原性細菌の量とは相関しないことも明らかになった。さらにわれわれは  $\alpha$ -galactosidase 活性は舌苔を主な発生源とする生理的口臭と関わっていることを明らかにし、本酵素が唾液の沈殿画分に存在することも報告した (Masuo et al. *Arch Oral Biol*, 2012)。

### 2. 研究の目的

グラム陰性菌のプロテアーゼが口腔内の含硫アミノ酸を分解すると揮発性硫黄化合物 (VSCs) が産生され、これが嗅覚閾値を越えると口臭として認識される。近年、グラム陽性菌の  $\alpha$ -galactosidase で糖タンパクの糖

鎖を切断しておくことプロテアーゼによるタンパク分解が促進されることが報告された。われわれは口臭クリニック患者に対して臨床研究を行い、 $\alpha$ -galactosidase が口臭産生に強く関与していることを明らかにした。本研究課題では VSCs 産生におけるグラム陽性菌の  $\alpha$ -galactosidase のプロテアーゼの役割を詳細に検討する。また、別の研究として、歯学部6年生の喫煙実態と生活習慣・ストレスとの関連について調査を行った。

### 3. 研究の方法

研究対象者は56名の口臭患者である (男性20名、女性36名、平均年齢  $47.9 \pm 13.5$  歳)。対象者に口臭に影響すると思われる全身疾患を有する者はいなかった。口臭の評価には、官能検査 (OLT)、ハリメーター、ガスクロマトグラフィーを用いた。口臭測定・口腔内診査・唾液採取は同日に、起床時より何もしない状態あるいは飲食、口腔清掃、喫煙より少なくとも5時間経過後におこなった。唾液採取にはガムテストを用い、5分間の刺激時唾液を回収した。嗅覚閾値は従来法に従って、 $\geq 0$ LT スコア3、 $\geq 100$  ppb のハリメーター値、 $\geq 2.5$  ng/10 mL mouth air の総VSC、 $\geq 1.5$  ng/10 mL mouth air の硫化水素、 $\geq 0.5$  mL mouth air のメチルメルカプタン、 $\geq 0.2$  ng 10 mL mouth air の硫化ジメチルとした。歯周病の有無は5ミリ以上の歯周ポケットの有無によって分類した。舌苔付着量は小島の分類を利用して0-4の5段階で評価した。ガラクトシダーゼ活性は、*o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) を基質に用いて測定した。サンプル中の総タンパク質の定量にはピシンコニン酸 (BCA) 法を利用した。唾液は遠心分離法によって上清と沈殿にわけ、沈殿については上清と等量の溶解液で溶解した。上清、沈殿溶解液、懸濁唾液の3サンプルについて、それぞれ酵素活性と総タンパク量を調べた。

また、別の研究として、歯学部6年生の喫煙実態と生活習慣・ストレスとの関連について調査を行った。本研究は、福岡歯科大学・福岡医療短期大学倫理委員会の承認を得て行った (第249号)。調査対象者51名のうち、結果の集計・分析について本人より同意を得た50名 (男39名、女11名、平均年齢  $25.6 \pm 2.1$  歳) を分析対象者とした。調査には、アンケート (喫煙状況、生活習慣、ストレス)、TDS (ニコチン依存症のスクリーニングテスト)、POMS 短縮版 (気分・感情を評価) を利用した。

### 4. 研究成果

ガラクトシダーゼは沈殿溶解液と懸濁唾液に認められ、唾液上清には認められなかった。全対象者における酵素活性と口臭パラメーターとの相関解析では、OLT スコア、ハリメーター値、総VSC、硫化水素、メチルメルカプタンとの間に弱い正の相関が認められた。酵素活性と口臭関連因子との相関は認められなかった。次に、歯周病を有する群と有

しない群において酵素活性と口臭パラメータの関係を調べた。その結果、歯周病を有しない群において、ガラクトシダーゼ活性とハリメーター値、総 VSC、硫化水素、メチルメルカプタン、硫化ジメチルとの間に強い正の相関関係が認められた。また口臭関連パラメータでは、舌苔付着スコアとの間に弱い正の相関が認められた。これに対し歯周病を有する群では、口臭測定値、口臭関連因子のいずれについても相関関係が認められなかった。

今後の課題では、これまでコントロールが困難だった生理的口臭における *-galactosidase* の役割を臨床的ならびに細菌学的に追求する。さらに VSCs 産生におけるグラム陽性菌の *-galactosidase* およびグラム陽性菌のプロテアーゼの役割を共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて詳細に検討する。

別の研究課題である、歯学部6年生の喫煙実態と生活習慣・ストレスとの関連について調査についての研究では、喫煙実態は、喫煙34% (17名)、前喫煙2% (1名)、ためし喫煙8% (4名)、喫煙未経験56% (28名) だった。喫煙群 (喫煙 + 前喫煙) は非喫煙群 (ためし喫煙 + 喫煙未経験) に比較して、平均年齢が有意に高く、留年生や浪人生の喫煙が多いと考えられた。生活習慣において喫煙群は好ましくない傾向があり、食習慣に関する3項目で2群間に統計学的有意差がみられた。また喫煙群は非喫煙群に比べて、ストレスを強く感じるとの回答率が高かった。POMS 短縮版の得点を比較したところ、喫煙群は非喫煙群に比べて「活気」が低く、「疲労」が高かった。喫煙と生活習慣・ストレスは密接に関係していることが明らかになった。

さらに喫煙群において TDS と POMS 「疲労」得点は、有意差はないが正の相関傾向を示した。ニコチンが欠乏するとイライラや倦怠感が生じ、タバコを吸わないと解消されなくなる。ニコチン依存度が高いほど疲れやすく、次のタバコを欲する心身状態になっていることが推測された。

#### 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2件)

1. Suzuki N, Yoneda M, Haruna K, Masuo Y, Nishihara T, Nakanishi K, Yamada K, Fujimoto A, Hirofuji T, Effects of S-PRG eluate on oral biofilm and oral malodor Archives of Oral Biology Volume59,issue 4, April 2014, Pages 407-413

2. Suzuki N, Yoneda M, Tanabe K, Fujimoto A, Iha K, Seno K, Yamada K, Iwamoto T, Masuo Y, Hirofuji T *Lactobacillus salivarrius* WB21-containing

tablets for the treatment of oral malodor: a double-blind, randomized, placebo-controlled crossover trial Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2013 Dec 20. pii: S2212-4403

(13)02088-9. doi:10.1016/j.oooo.2013.12.400. PMID:24556493

〔学会発表〕(計2件)

1. N. Suzuki, M. Yoneda, K. Tanabe, A. Fujimoto, K. Iha, K. Seno, T. Iwamoto, K. Yamada, Y. Masuo, K. Haruna, T. Hirofuji Improvement of oral malodour using *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets WCPD ハンガリー 2013.10.8-14

2. 榊尾陽介、谷口奈央、福地浩文、藤本暁江、伊波幸作、萩尾佳那子、米田雅裕、廣藤卓雄

歯学部6年生の喫煙実態と生活習慣・ストレスとの関連

第7回日本総合歯科学会総会(大阪)

2014.11.28-30

〔図書〕(計0件)

〔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:

出願年月日:

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 榊尾陽介  
福岡歯科大学(歯学部)

研究者番号: 25862069

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：