

令和元年5月29日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26463175

研究課題名(和文)喫煙による舌苔細菌叢の変化が口臭に及ぼす影響

研究課題名(英文)Influence of change of tongue microbiota by smoking on oral malodor

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：健康な成人ボランティア50名(男39名、女11名、平均年齢 25.6 ± 2.1 歳)を対象に、唾液と舌苔の菌叢解析と唾液中の免疫系バイオマーカーの計測を行い、喫煙者と非喫煙者の間の違いを調べた。喫煙者の口腔内で有意に割合が高かったDialister属、Atopobium属、Treponema属、Selenomonas属は、過去の研究で歯周病や口臭への関与が報告されている。また、唾液中の免疫系バイオマーカーでは、非喫煙群に比べ喫煙群でIL-1betaが有意に高く、ブリンクマン指数との相関ではTNF-alphaに正の相関がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喫煙は歯周病の最大環境要因であるだけでなく、全身のさまざまな疾患の発症や進行に関係している。本研究の結果、臨床的に口腔および全身に問題がない若者において、既に菌叢や免疫システムが喫煙の影響を受けていることが明らかになり、十数年後に発症する歯周病や口臭、さらには全身疾患の基盤が構築されている可能性が示唆された。さらに、本研究で喫煙者において口臭関連細菌の割合が高いことが明らかになり、歯周病を介さない喫煙の口臭への直接的な関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Microbial compositions of saliva and tongue and immune system biomarkers in saliva were analyzed in 50 healthy adult volunteers (39 males, 11 females, average age 25.6 ± 2.1 years), and the differences of them between smokers and non-smokers were assessed. Four bacterial genera including Dialister, Atopobium, Treponema, and Selenomonas, which accounted for significantly higher rate in the oral cavity of smokers, have been reported as genera involved in periodontal diseases and oral malodor in the past studies. In addition, with regard to immune system biomarkers in saliva, IL-1beta was significantly higher in the smoking group than in the nonsmoking group, and a positive correlation between TNF-alpha and the Brinkman index was found.

研究分野：予防歯科学

キーワード：口臭 口腔内細菌 舌苔 喫煙 菌叢解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口臭の大部分は口腔由来であり、原因となる歯科的問題として、舌苔、歯周病、口腔清掃不良、口腔乾燥、う蝕、不適合修復物、口内炎などがある。また、ストレスや免疫力低下は、唾液減少や口腔内細菌の増加をもたらす、口臭のリスクになると考えられている。口臭の主成分は、硫化水素やメチルメルカプタンなどの揮発性硫黄化合物 (volatile sulfur compounds, VSCs) である。VSCs は、口腔内に棲息する嫌気性菌がプラークや舌苔などに含まれる剥離上皮細胞、血球成分、死菌などのタンパク質成分を分解することによって発生する。VSCs の主な発生部位は“舌苔”であり、VSCs と舌苔中の嫌気性菌数との間には正の相関関係がある (Tanaka M, et al. *Microbes Infect* 2004;6:1078-1083)。

喫煙は歯周病の環境因子からみた最大のリスク因子とされている。歯周病は口臭の主な原因であるため、喫煙は間接的に口臭に関係していると言える。しかしながら、喫煙と口臭の直接的な関連については、舌苔付着量と喫煙との間に弱い相関関係が報告されている以外に殆ど報告がない (Van Tornhout M, et al. *J Clin Periodontol* 2013;40:180-185)。舌は、歯周ポケットよりも直接的にタバコの有害物質に曝露される部位であり、舌苔の細菌叢は喫煙によって大きな影響を受けることが予想されるため、喫煙によってもたらされる舌苔の細菌構成の変化と口臭発生との関連性を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

16S rRNA 遺伝子領域を用いた配列解析を用いて、喫煙者と非喫煙者の唾液および舌苔の細菌構成の違いを調べた。全身疾患と歯周病の進行が口臭と細菌構成に大きな影響を与えると考えられるため、その影響を排除するために、臨床的に健康な口腔内を持つボランティアを対象とした。喫煙による局所の免疫システムの変化も口臭や舌苔の細菌構成に関係する可能性があるため、本研究では唾液中の免疫系バイオマーカーの定量解析も併せて実施した。

3. 研究の方法

臨床的に健康な口腔内を持つボランティア 50 名 (男性 39 名、女性 11 名、平均年齢 25.6 ± 2.1 歳) を対象に刺激唾液と舌苔を採取した。続いて、唾液と舌苔から口腔内細菌 DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子領域を PCR で増幅し、高速シーケンス法を用いて配列解析を行い、喫煙者と非喫煙者の間における相違を評価した。またプリンクマン指数と各菌属の割合との相関を調べ、喫煙量の影響を評価した。被験者のうち安静時唾液を採取できた 49 名 (男性 39 名、女性 10 名) については、免疫系バイオマーカー (Cortisol, IgA, IL-1 β , IL-6, TNF- α) を ELISA 法で定量し、喫煙者と非喫煙者の間における相違を評価した。サンプル採取は、食事・喫煙から 2.5 時間経過した午後 (15:30 頃) に行った。研究は、福岡学園倫理審査委員会の承認を得て行った (承認番号第 249 号)。

4. 研究成果

被験者 50 名のうち喫煙者は 18 名、非喫煙者は 32 名だった。菌叢解析の結果、唾液と舌苔をあわせて、99 属、228 種が得られた。喫煙者と非喫煙者で構成する菌種数に大きな違いはなかった。舌苔と唾液の間における細菌叢の多様性は有意に異なっていたが、喫煙者と非喫煙者の間で、細菌叢の多様性に有意な違いはみられなかった。喫煙者と非喫煙者との間に有意差がみられた菌属は、舌苔では、喫煙者で割合が低かったものとして *Haemophilus* 属、*Gemella* 属、*Peptostreptococcus* 属などがあり、喫煙者で割合が高かったものとして *Dialister* 属と

Atopobium 属があった (表 1)。また唾液では、喫煙者で割合が低かったものとして *Capnocytophaga* 属と *Cardiobacterium* 属があり、喫煙者で割合が高かったものとして *Treponema* 属と *Selenomonas* 属があった。喫煙者で割合が高かった *Dialister* 属、*Treponema* 属、*Selenomonas* 属は歯周炎との関連がこれまでに報告されている。*Treponema* 属は VSCs 高産生菌であることが報告されている。また *Atopobium* 属、*Dialister* 属、*Selenomonas* 属は、我々の過去の口臭に関連する菌叢解析においてメチルメルカプタン高産生型細菌叢で高い割合を示した菌属である (Takeshita T, et al. *Sci Rep* 2012;2:215)。

表 1. 喫煙者と非喫煙者との間に有意差があった菌 (属)

喫煙者で割合が低かったもの	喫煙者で割合が高かったもの
舌苔	舌苔
<i>Haemophilus</i> 属	<i>Dialister</i> 属
<i>Gemella</i> 属	<i>Atopobium</i> 属
<i>Peptostreptococcus</i> 属	
<i>Catonella</i> 属	唾液
<i>Peptostreptococcaceae</i> 属	<i>Treponema</i> 属
	<i>Selenomonas</i> 属
唾液	
<i>Capnocytophaga</i> 属	
<i>Cardiobacterium</i> 属	

被験者のうち安静時唾液を採取できた 49 名 (喫煙者 18 名、非喫煙者 31 名) の唾液中の免疫系バイオマーカーの定量を行ったところ、喫煙者で SIgA、TNF- α 、IL-1 β が高く、IL-1 β は非喫煙者との間に統計学的有意差がみられた (図 1)。続いてプリンクマン指数との相関を調べたところ、TNF- α 、SIgA に正の相関があり、TNF- α で統計学的有意差がみられた (図 2)。

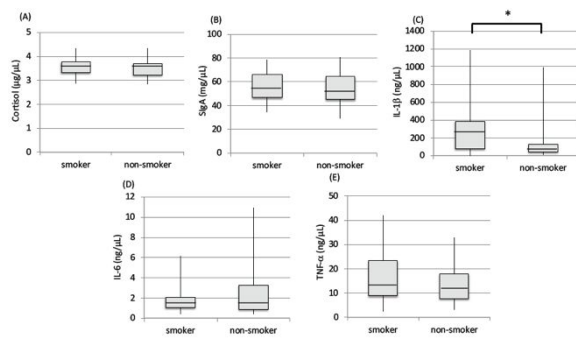


図 1. 喫煙者と非喫煙者との唾液中免疫系バイオマーカーの定量比較
Cortisol (A), SIgA (B), IL-1 β (C), IL-6 (D), TNF- α (E)
* $P < 0.05$ by liner regression analysis after adjusting for age

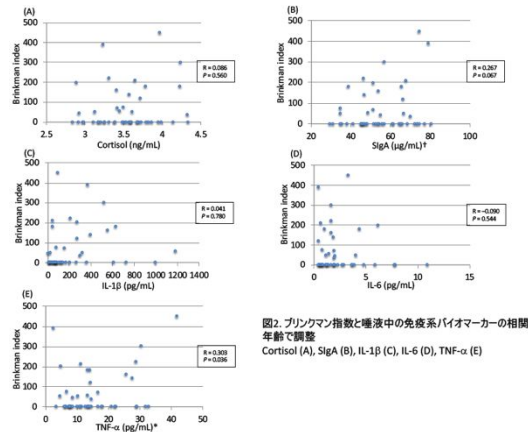


図 2. プリンクマン指数と唾液中の免疫系バイオマーカーの相関
年齢で調整
Cortisol (A), SIgA (B), IL-1 β (C), IL-6 (D), TNF- α (E)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 28 件)

1. Suzuki N, Yoneda M, Takeshita T, Hirofujii T, Hanioka T. Induction and Inhibition of Oral Malodor. *Mol Oral Microbiol* 34:85-96, 2019. 総説 査読有 doi: 10.1111/omi.12259.
2. Hanioka T, Morita M, Yamamoto T, Inagaki K, Wang PL, Ito H, Morozumi T, Takeshita T, Suzuki N, Shigeishi H, Sugiyama M, Ohta K, Nagao T, Hanada N, Ojima M, Ogawa H. Smoking and periodontal microorganisms. *Jpn Dent Sci Rev* 55:88-94, 2019. 総説 査読有 doi: 10.1016/j.jdsr.2019.03.002.

3. Nakano Y, Suzuki N, Kuwata F. Predicting oral malodour based on the microbiota in saliva samples using a deep learning approach. *BMC Oral Health* 18:128, 2018. 原著 査読有 doi: 10.1186/s12903-018-0591-6.
4. Higuchi T, Suzuki N, Nakaya S, Omagari S, Yoneda M, Hanioka T, Hirofuji T. Effects of *Lactobacillus salivarius* WB21 combined with green tea catechins on dental caries. *Arch Oral Biol* 98:243-247, 2018. 原著 査読有 doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.11.027.
5. Nakamura S, Shioya K, Hiraoka BY, Suzuki N, Hoshino T, Fujiwara T, Yoshinari N, Yoshida A. *Porphyromonas gingivalis* hydrogen sulfide enhances methyl mercaptan-induced pathogenicity in mouse abscess formation. *Microbiology* 164:529-539, 2018. 原著 査読有 doi: 10.1099/mic.0.000640.
6. Suzuki N, Nakano Y, Watanabe T, Yoneda M, Hirofuji T, Hanioka T. Two mechanisms of oral malodor inhibition by zinc ions. *J Appl Oral Sci* 26:e20170161, 2018. 原著 査読有 doi: 10.1590/1678-7757-2017-0161.
7. Hanioka T, Ojima M, Tanaka K, Taniguchi N, Shimada K, Watanabe T. Association between secondhand smoke exposure and early eruption of deciduous teeth: a cross-sectional study. *Tob Induc Dis* 16:1-9, 2018. 原著 査読有 doi: 10.18332/tid/84892.
8. Sharma P, Suzuki N, Chandrashekar BR, Thippeswamy HM, Hirofuji T, Tanabe K, Hanioka T, Avinash BS. Probiotic *Lactobacillus salivarius* WB21 tablets on oral malodor among patients attending dental institution in Mysuru city, India-an open label pilot trial. *J Dent Oral Care* 4:1-8, 2017. 原著 査読有 doi: 10.15436/2379-1705.17.1381.
9. Suzuki N, Higuchi T, Nakajima M, Fujimoto A, Morita H, Yoneda M, Hanioka T, Hirofuji T. Inhibitory effect of *Enterococcus faecium* WB2000 on volatile sulfur compound production by *Porphyromonas gingivalis*. *Int J Dent* 2016:8241681, 2016. 原著 査読有 <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8241681>
10. Suzuki N, Fujimoto A, Yoneda M, Watanabe T, Hirofuji T, Hanioka T. Resting salivary flow independently associated with oral malodor. *BMC Oral Health* 17:23, 2016. 原著 査読有 doi: 10.1186/s12903-016-0255-3.
11. Suzuki N, Nakanishi K, Yoneda M, Hirofuji T, Hanioka T. Relationship between salivary stress biomarker levels and cigarette smoking in healthy young adults: an exploratory analysis. *Tob Induc Dis* 14:20, 2016. 原著 査読有 doi: 10.1186/s12971-016-0085-8.
12. Yoneda M, Suzuki N, Fujimoto A, Ishii A, Yamada K, Masuo Y, Iwamoto T, Haraga M, Koga C, Morita H, Inoue Y, Hirofuji T. A case of oral malodor: improving the motivation of patients by use of bacterial examination. *J Oral Hyg Health* 4:200, 2016. 症例報告 査読有 doi: 10.4172/2332-0702.1000203.
13. Hanioka T, Haresaku S, Suzuki N, Shimada K, Watanabe T, Ojima M, Fujie K, Watanabe M. A natural experiment for inferring causal association between smoking and tooth loss: a study of a workplace contemporary cohort. *IJSMR* 4:331-336, 2015. 原著 査読有 doi: 10.6000/1929-6029.2015.04.04.3.
14. 谷口奈央、仲西宏介、米田雅裕、埴岡 隆、廣藤卓雄、歯学部学生の喫煙習慣と心理的健康感との関連. *口腔衛生会誌* 65:422-425, 2015. 原著 査読有 http://doi.org/10.5834/jdh.65.5_422.

15. Yoneda M, Suzuki N, Morita H, Hirofuji T. Oral bacteria and bowel diseases-mini review. J Gastrointest Dig Syst 6:404, 2016. 総説 査読有 doi: 10.4172/2161-069X.1000404.
16. Yoneda M, Suzuki N, Hirofuji T. Antibacterial effect of surface pre-reacted glass ionomer filler and eluate - mini review. Pharm Anal Acta 6:349, 2015. 総説 査読有 doi: 10.4172/2153-2435.1000349.
17. Yoneda M, Suzuki N, Hirofuji T. Current status of the techniques used for halitosis analysis. Austin Chromatography 2:1024, 2015. 総説 査読有
<https://www.austinpublishinggroup.com/chromatography/fulltext/chromatography-v2-id-1024.php>

〔学会発表〕（計 76 件）

1. 埴岡 隆、谷口奈央、渡辺 猛、島津 篤、内藤麻利江、高江洲 雄、小島美樹、小川祐司、WHO 推奨歯科簡易タバコ介入の日本版 e-learning の開発、第 39 回九州口腔衛生学会、2018.9.9 (鹿児島市)
2. 谷口奈央、太田純明、中野善夫、埴岡 隆、歯周基本治療における乳酸菌配合タブレットの継続摂取の影響についての細菌学的検討、第 60 回歯科基礎医学会、2018.9.5-7 (福岡市)
3. 谷口奈央、藤本暁江、渡辺 猛、島津 篤、内藤麻利江、廣藤卓雄、埴岡 隆、口臭のリスク診断に有用な新しい唾液成分と口腔機能の検査項目の探索、第 67 回日本口腔衛生学会総会、2018.5.18-20 (札幌市)
4. 埴岡 隆、廣藤卓雄、谷口奈央、小島美樹、小川祐司、日本の歯科医療への WHO 簡易タバコ介入法の統合導入研修プログラム開発、第 67 回日本口腔衛生学会総会、2018.5.18-20 (札幌市)
5. 中野善夫、谷口奈央、桑田文幸、埴岡 隆、細菌叢解析に基づく機械学習による口臭の判別、第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017.9.16-18 (松本市)
6. 中野善夫、谷口奈央、桑田文幸、口腔内細菌叢の 5 連続塩基出現頻度に基づく解析法、第 90 回日本細菌学会総会、2017.3.19-21 (仙台市)
7. 中野善夫、谷口奈央、桑田文幸、連続塩基出現頻度に基づいた菌叢構成種解析、第 39 回日本分子生物学会年会、2016.11.30-2016.12.1 (横浜市)
8. 谷口奈央、中野善夫、廣藤卓雄、埴岡 隆、喫煙が舌苔と唾液の細菌叢に与える影響、第 38 回九州口腔衛生学会、2016.9.4 (福岡市)
9. 埴岡 隆、谷口奈央、渡辺猛、小島美樹、ウェブベースの卒前臨床教育プログラム：WHO が推奨する歯科での簡易禁煙介入、第 38 回九州口腔衛生学会、2016.9.4 (福岡市)
10. 谷口奈央、“口腔フローラと健康”乳酸菌を利用した口腔の健康管理、シンポジウム「腸内細菌と健康保持 - 最新の研究 -」第 20 回腸内細菌学会、2016.6.10 (東京)
11. 谷口奈央、中野善夫、米田雅裕、森田浩光、藤本暁江、桑田文幸、廣藤卓雄、埴岡 隆、喫煙が舌苔の細菌叢に与える影響、第 7 回日本口臭学会、2016.6.18-19 (名古屋市)
12. 谷口奈央、中野善夫、米田雅裕、廣藤卓雄、桑田文幸、埴岡 隆、健康な若者における喫煙者と非喫煙者との口腔内細菌構成の違い、第 89 回日本細菌学会総会、2016.3.23-25 (大阪市)
13. 谷口奈央、中野善夫、米田雅裕、廣藤卓雄、桑田文幸、埴岡 隆、歯学部学生における喫煙者と非喫煙者の唾液および舌苔の細菌叢解析、第 42 回福岡歯科大学学会総会、2015.12.13 (福岡市)

14. 中野善夫、谷口奈央、桑田文幸、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 (神戸市)
15. Taniguchi N, Nakanishi K, Yoneda M, Morita H, Hanioka T, Hirofujii T, The relationship between salivary biomarkers and smoking in healthy young adults, 第 63 回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会、2015.10.30-31 (福岡市)
16. 中野善夫、谷口奈央、米田雅裕、廣藤卓雄、桑田文幸、埴岡 隆、歯学部学生における喫煙者と非喫煙者の口腔内細菌叢の比較、第 57 回歯科基礎医学会、2015.9.11-13 (新潟市)
17. 谷口奈央、口臭治療における舌苔の意義、シンポジウム「舌苔をどう考えるか」、第 6 回日本口臭学会、2015.7.4-5 (新潟市)
18. 仲西宏介、谷口奈央、米田雅裕、榎尾陽介、藤本暁江、萩尾佳那子、埴岡 隆、廣藤卓雄、唾液マーカーを用いたストレスと喫煙の関連性についての研究、第 142 回日本歯科保存学会、2015.6.25-26 (北九州市)
19. 谷口奈央、仲西宏介、米田雅裕、廣藤卓雄、喫煙習慣とストレスとの関連性、第 64 回日本口腔衛生学会、2015.5.17-19 (つくば市)
20. 榎尾陽介、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、大学生の喫煙とライフスタイル・ストレスとの関連性、第 41 回福岡歯科大学学会総会、2014.12.14 (福岡市)

〔図書〕(計 1 件)

1. Suzuki N, Yoneda M, Hirofujii T. Evidence based control of oral malodor. Emerging trends in oral health sciences and dentistry. Book Editor: Mandeep Singh Viridi, In Tech, 801-816, 2015 March 11. 著書 査読有 doi: 10.5772/58660.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：廣藤 卓雄

ローマ字氏名：Hirofujii Takao

所属研究機関名：福岡歯科大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：10189897

研究分担者氏名：中野 善夫

ローマ字氏名：Nakano Yoshio

所属研究機関名：日本大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：80253459