

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09912

研究課題名(和文) 疫学研究に適用可能な、唾液の液体分析法による多検体自動処理の口臭検査法の開発

研究課題名(英文) Development of a multi-specimen automated halitosis testing method applicable to epidemiological studies by liquid analysis of saliva.

研究代表者

伊藤 博夫 (ITO, Hiro-0)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授

研究者番号：40213079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で、汎用のアミノ酸分析法であるオルトフタルアルデヒド(OPA)法を基盤として、分析対象をチオール類としたOPA変法を考案した。すなわち、OPA変法の反応生成物であるイソインドールの蛍光を測定することにより、汎用機器である高速液体クロマトグラフィーを用いる高感度分析の可能性を明らかにした。さらに、かさ高いアルキル基置換の導入による立体保護効果によって安定化されたイソインドール誘導体の合成に成功し、当OPA変法の口臭検査法としての応用可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口臭は多くの人々が気に掛けている臭いの一つであるが、自分の口臭は自分ではわからず、また他人指摘するのも抵抗感があるため、客観的な口臭の機器分析のニーズが存在する。現在行われているガス分析による口臭検査は、時間と設備の制約を大きく受けるため、多検体処理が困難であり、集団検診へ応用することは不可能である。本研究では、この問題の革新的改良につながる、液相におけるメチルメルカプタンの有機化学的な間接検出法の開発のための基盤を確保した。将来この方法を改良・応用し、集団の口臭保有状況についての実態を調査する疫学調査研究を可能にし、歯周病予防のための迅速集団検診への応用などが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we devised a variant method of ortho-phthalaldehyde (OPA) method, which is a general-purpose method for amino acid analysis, using thiols as the analytes. By measuring the fluorescence of isoindole, a reaction product of the OPA method, the possibility of highly sensitive analysis using high-performance liquid chromatography, a general-purpose instrument, was clarified. Furthermore, we succeeded in synthesizing isoindole derivatives stabilized by the steric protection effect of the introduction of bulky alkyl substituents, suggesting the possibility of application of this OPA variation method as a halitosis test.

研究分野：医歯薬学(社会系歯学・予防歯学)

キーワード：予防歯学 口臭 歯周病 有機化学 ハイスループット分析 オルトフタルアルデヒド(OPA) メチルメルカプタン(メタンチオール) 液体クロマトグラフィー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに実用化されている,ガスクロマトグラフィーを用いた口臭の精密測定法や,センサーチップを用いたポータブル装置による簡易式口臭検査は,いずれも呼気ガスの直接分析であり,呼気検体を採取後直ちに測定する必要がある上に,一人の検査に10分以上の時間を要するため,集団検診などで採用することは不可能である。このため口臭の疫学的な実態は,これまで全く明らかになっていない。

一方,有機化学や創薬化学の分野では,グルタチオンなどの生体内チオールやカテプシン類の酵素システイン残基に対して特異的に反応性を示す化合物の合成開発が活発に展開されてきた。研究分担者の佐野は,過去にシステインプロテアーゼ阻害剤の合成研究を行い,生体内チオール類と反応する有機化合物の合成を行ってきた。予防歯学を専門とする研究代表者の伊藤は,佐野の協力を得て有機化学反応に基づく呼気ガス中の揮発性硫黄化合物の検出法の開発に取り組み,本研究計画の基礎となる成果を得てきた。

本研究課題の学術的な独創性は,口臭を測定する検体としてガス(呼気)ではなく液体(唾液)を使用する新しい測定方法の開発を目指す点である。定量的・客観的で,高精度・高感度な口臭検査の実現可能性を追求する。液体を検体に使用することにより,多検体自動処理への道が開かれ,集団検診や疫学調査への応用の可能性が見えてくる。

2. 研究の目的

現行のガス分析による口臭検査は,時間と設備の制約を大きく受けるため多検体処理が困難であり,集団検診へ応用することは不可能である。このため,口臭の疫学的な実態は,これまで全く明らかになっていない。本研究では,口臭の原因となる揮発性硫黄化合物のうち,歯周病による病的口臭との深い関連性が示唆されているメチルメルカプタン(別名メタンチオール)をターゲットとして,この問題の革新的改良につながる,液相におけるメチルメルカプタンの有機化学的な間接検出法を開発する。

口臭の測定を,従来のガスクロマトグラフィーによる直接的検出法に代わって,液相への捕捉・誘導体化という有機化学的アプローチによって検出するという試みは,他に例のない当研究チームの独創的着想である。為害性のない,唾液の口臭物質検査は,歯周病のスクリーニング検査として,現行の時間と労力がかかり為害性も懸念される歯周組織検査法に代わり得る可能性からも期待が持たれる。

3. 研究の方法

口臭の原因となる揮発性硫黄化合物のうち,歯周病による病的口臭との密接な関連性が示されているメチルメルカプタン(別名メタンチオール)をターゲットとして,液相における有機化学反応を用いた新しい間接的メチルメルカプタン検出法の開発を目指した。

(1) オルトフタルアルデヒド法(OPA法)を基盤として,分析対象をチオール類に変更したOPA変法の開発

OPA法のアミン成分としてトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(トリス)を用い,OPAとn-プロパンチオールの3成分縮合反応を行い,反応生成物のイソインドールを検出・分析した。不安定なイソインドール反応生成物のヒドロキシ基を,ベンゾイル化,あるいはパルミトイル化してかさ高いアルキル基を導入することによる反応生成物の安定化,すなわち検出感度の向上を試みた。

(2) OPA法のアミン成分として用いるトリスのヒドロキシ基の反応前修飾によるイソインドール反応生成物の安定性向上

OPA法のアミン成分として使用するトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの3つのヒドロキシ基をあらかじめ化学修飾することで,チオール捕捉反応剤に有効な,かさ高い一級アミンを探索した。ヒドロキシ基をベンジル基で保護する方法,側鎖の炭素鎖を長くする方法,そのエステル体の合成等を検討した。分子設計のための実験過程では,n-プロパンチオールを標的チオールとして反応を行い,反応生成物の安定性を各種温度の保存条件においてプロトン NMR スペクトルの変化に基づき判定した。

(3) メチルメルカプタンに由来するイソインドール誘導体の高速液体クロマトグラフィー分析条件の検討

口臭検査時の標的チオールであるメチルメルカプタンの間接検出法の開発に向け,メチルメルカプタン由来のイソインドール誘導体の高速液体クロマトグラフィー分析による分離分析条件を検討した。

(4) 不安定なイソインドール反応生成物の酸化反応による安定化

かさ高い第一級アミンは反応感受性の点で不利であるため,イソインドール反応生成物の安定化のために別の方法を検討した。すなわち,イソインドール反応生成物のチオール部分を酸化してスルホキシド構造とすることで安定化を検討した。

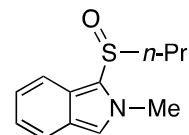
(5) ヒトにおける口臭測定実験系の構築のための研究(シミュレーション実験系の開発を含め)

4. 研究成果

(1) アミノ酸分析法として汎用されているオルトフタルアルデヒド(OPA)法に着目し,分析対

(4) OPA および *n*-プロパンチオール, トリス(ヒドロキシプロピル)アミノメタンより合成した嵩高い第一級アミンとの3成分縮合反応の結果を基盤とし, *n*-プロパンチオール(硫黄原子)に変えて 9,10-ジヒドロ-9-オキサ-10-ホスファフェナントレン-10-オキシド(DOPO)(リン原子)を求核剤とする3成分縮合反応を検討した。この場合には, 嵩高い第一級アミンを用いることなく単離精製可能な安定なイソインドール誘導体が得られることが明らかになった。すなわち, 第一級アミンとしてメチルアミンを用いた反応においても, 対応するイソインドール誘導体を単離精製することが可能であり, DOPO 由来の P=O 部分の電子求引性効果による安定化が強く示唆された。

DOPO の反応をヒントに, OPA および *n*-プロパンチオール, 第一級アミンの3成分縮合反応により生成する不安定なイソインドール誘導体の硫黄原子を酸化することにより, 安定なイソインドール誘導体へと変換することが可能ではないかと考え, OPA, *n*-プロパンチオール, およびメチルアミンより合成した極めて不安定なイソインドール誘導体の粗生成物を, 2-ヨードキシ安息香酸 (IBX) を用いる温和な条件により酸化した。その結果, スルホキシド (S=O) 構造を有するイソインドール誘導体を単離精製することに成功した。すなわち, 既存の OPA 法で得られる不安定なイソインドールを酸化反応によって安定化できるという可能性が示された。



(5) ヒトにおける口臭測定実験系の構築のための研究

舌ブラシによる口臭抑制効果の予備的検討を行った。全身的に健康で喫煙習慣のない被験者7名において, 舌ブラシによる舌清掃の前後で, 口臭レベルの変化と, ブラシの種類による口臭抑制効果の違いが認められた。開発中の有機化学的分析による間接的口臭分析法を検討するために有用な実験モデルの確立に近づいた。

(6) 唾液口臭検査の検討のためのシミュレーション実験系構築のための研究

人間の唾液を使用する研究が, 新型コロナウイルス問題のため遂行困難になってしまった。そこで, 歯周病関連細菌の液体培養系を用い, ヒト口臭の呼気検査, および我々が開発を目指す唾液検査のシミュレーション実験系の構築に着手した。今後の液相口臭測定法開発のための研究の推進にとって有用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakao M, Nishikiori N, Nakamura A, Miyagi M, Shibata, N, Kitaike S, Fukui M, Ito, H-O, Sano, S	4. 巻 2
2. 論文標題 Synthesis of Sterically Protected Isoindoles from ortho-Phthalaldehyde.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 SynOpen	6. 最初と最後の頁 50-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0036-1591932	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tominaga Y, Usui K, Hirata A, Ito H-O, Nokihara K	4. 巻 26
2. 論文標題 Applications of a novel biodetection system to saliva using protein fingerprints with data processing.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem.	6. 最初と最後の頁 3210-3216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmc.2018.04.049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 仲村明人、中尾允泰、佐野茂樹.
2. 発表標題 DOPOを求核剤とする安定型イソインドール誘導体の合成.
3. 学会等名 第58回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大川翔平, 間島希璃子, 玉木直文, 伊藤博夫
2. 発表標題 舌ブラシの形態による舌清掃の効果と出血の比較
3. 学会等名 徳島県歯科医学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大毛 健一郎, 野上 幸裕, 玉木 直文, 三木 かなめ, 伊藤 博夫
2. 発表標題 口腔内清掃による口臭値と口腔内細菌数指標の変化
3. 学会等名 第55回四国歯学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	佐野 茂樹	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授	
	(SANO Shigeki)		
	(20226038)	(16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------