

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593081

研究課題名(和文)新しい口臭測定シートの開発

研究課題名(英文)A novel visual test for hydrogen sulfide on the tongue dorsum

研究代表者

兼平 孝(KANEHIRA, TAKASHI)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：90194935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：我々は硫化水素をはじめとするVSC(揮発性硫黄化合物)に特異的な呈色反応を示す薬剤を吸着させた綿棒を開発した。今回の研究では、被験者の口腔内VSCとキット綿棒の発色量の間には、硫化水素に比較的高い相関関係が認められた。硫化水素が口臭の悪臭成分の多くを占めることから、舌苔を擦過し、メチレンブルーテクニックにより発色させる本法は、口臭のスクリーニング方法の1つとして有用であることが示唆された。しかし、実用化に向けては、発色に至る術式の簡略化や発色量の増感など、克服しなければならない問題点がいくつか浮かび上がった。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel colorimetric system for direct detection of hydrogen sulfide on the tongue dorsum from subjects with complaints of halitosis. The results of this study suggested that the novel assay system can be used as a visual warning sensor for halitosis by measuring hydrogen sulfide on the tongue dorsum.

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 硫化水素 メチルメルカプタン ジメチルサルファイド 舌苔 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

成人の約 70%が自分の口腔に何らかの自覚症状や悩みをかかえ、そのうちの 15%が口臭に関することであるという。

口臭の原因は、臨床的には老若男女問わず、口腔乾燥症(ドライマウス)によるものが最も多く、残りは重度の歯周病や口腔清掃不良である。

口腔乾燥症の原因として、若年層では口呼吸、中高年層では口呼吸に加えて更年期障害や薬剤の副作用などによる安静時唾液の減少が挙げられている。口腔粘膜の乾燥により、口腔内の自浄作用が低下、揮発性硫黄化合物(VSC)など様々な悪臭物質が発生・滞留しやすくなり、中でも舌背に付着する舌苔がVSC産生の中心になると考えられている。

大部分の者にとって、自分の口臭はわかりにくい。他人の口臭は感じることもできても自分の口臭には嗅覚が鈍麻し、自分に口臭があるのか認識できなくなる。そのため口臭がほとんどないにもかかわらず、自分の口臭を不必要に気にする、いわゆる“自臭症”の患者が臨床的に散見されるが、そうした患者が口臭に悩むのは、自分の口臭の有無を手軽に判定する方法がないことも一因である。

一般に口臭の診断には、熟練した術者の嗅覚による官能検査、簡易型測定器(オーラルクロマなど)、本格的な機器(ガスクロマトグラフィー)によるものなどがあるが、いずれも個人が家庭で行えるものではない。口臭測定チェッカーとして、半導体センサーを用いたハンディタイプの口臭測定器も販売されているが、香料などの口臭以外の臭い成分に反応すること、測定値が不安定であることなど、まだ“玩具”の域を出ておらず、口臭を客観的に判定できるものではない。

我が国以外の諸外国においても、簡便で目視で判定できる方法が未だに確立していないことから、個人用の口臭判定キットは未だに製品化されていないのが現状である。

2. 研究の目的

そうした背景から個人用の口臭判定キットには、個人に加えて、口臭測定機器のない歯科医院や集団歯科健診などのスクリーニング目的で一定の需要が存在すると考えられる。

今回、VSCに特異的な呈色反応を示す薬剤を塗布することにより、簡便に家庭や歯科医院のチェアサイドで目視による口臭の判定が可能なシートが開発できるのではないかとこの着想に至った。

研究開始後、実際に口腔内のVSCを吸着させるには、シートでは時間がかかり過ぎるため、綿棒で直接舌苔を擦過し、VSCを付着させることがより適切であることが明らかとなった。

そのため本研究では、VSCに特異的な呈色反応を示す薬剤を吸着させた綿棒を作成、研究に使用した。

3. 研究の方法

(1) 基礎研究

材料

N,N'-ジメチル-*p*-フェニレンジアミン(関東化学製)、硫酸亜鉛(Sigma)、硫化水素標準品(トルエン溶液)、塩化鉄()、硫化ナトリウム、塩酸、リン酸二水素カリウム、セチルピリジニウム、塩化アンモニウム、過マンガン酸カリウム(いずれも和光純薬製)、セルロースろ紙(Advantec製、厚さ:0.7 mm、長さ:25 mm、直径:4.5 mm)、綿棒(サンリツ製特別製作品、長さ:15 mm、直径:4.7 mm、吸水量:120 μ L)、ガラス製バイアル(容量 15 mL、コーニング社製)

硫化水素の定量法

硫化水素は3つの方法によって定量した。

1. ガスクロマトグラフィー(QP5000、島津製作所製)による定量
2. オーラルクロマ(アビメディカル製)による定量
3. メチレンブルーテクニック(*N,N'*-ジメチル-*p*-フェニレンジアミンと塩化鉄によるFischerのカップリング反応により、青色に発色させるもの)による定量

口臭判定キット用綿棒の製作

今回、特別製作した綿棒に100 μ Lの20%硫酸亜鉛溶液を吸収させた後、室温で1時間乾燥させた。その後、オートクレーブにより滅菌、アルミホイルで包装、室温で保存した(以下、“キット綿棒”と略)。

メチレンブルーテクニックによる硫化水素の定量(図1)

1. キット綿棒への硫化水素の吸着
2. 30 μ Lの*N,N'*-ジメチル-*p*-フェニレンジアミン溶液を添加(30秒間)
3. 15 μ Lの塩化鉄()溶液の添加(5分間)して発色
4. 50 μ Lの固定液を添加、発色を安定化
5. 発色状態を簡易型分光光度計(日本電業工業 NF333型)にて測定(波長 660 nm)

なお、この反応では、茶色などメチレンブルー以外の色素が生成する。それを除去するため、2.~4.では、別途製作した筒状のセルロース紙(長さ 25 mm)を綿棒部分の下から挿入して、それらの色素を吸収させながら行った(図2)。

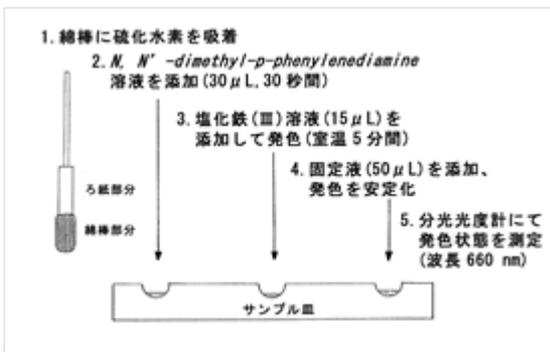


図1 メチレンブルーテクニックによる硫化水素の定量

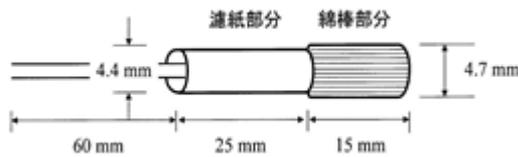


図2 綿棒の構造

種々の硫化水素濃度におけるキット綿棒の発色状況の評価

5段階の濃度に調整した硫化水素（トルエン溶液中）をキット綿棒に吸着させ、メチレンブルーテクニックにより発色状況の評価した。

種々の曝露時間におけるキット綿棒の発色状況の評価

バイアル（容量 15 mL）内において、硫化ナトリウムと塩酸から発生させた気体状の硫化水素（濃度 230 ng/15 mL、460 ng/15 mL）にキット綿棒を一定時間曝露させ、メチレンブルーテクニックにより曝露時間（2～180分）による発色状況の評価した。なお、合成した硫化水素の純度および濃度はガスクロマトグラフィーで確認、定量した。

(2) 臨床研究

本研究は北海道大学病院に設置されている高度先進医療支援センター自主臨床研究事務局に研究計画を提出して審査を申請、承認を得たものである。

被験者

北海道大学病院・歯科診療センター・予防歯科・口臭外来受診者で、次の条件に該当する者を被験者とした。

1. 本研究の意義を理解し、研究への参加に同意した者
2. 過去6か月以内に喫煙歴がない者
3. 測定当日に、口臭の原因となりうる飲食物、アルコール等を摂取しない者

なお、被験者には、測定2時間前から、飲食や歯みがき、うがいを控えてもらった。

口臭の測定

被験者には、問診の後、歯式や歯周ポケットの測定、口腔粘膜の乾燥度の診査を行った。また、口臭は官能検査の後、オーラルクロマ（アビメディカル製）にて、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（ $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ ）などの口腔内のVSC濃度を測定した。

綿棒による舌苔の擦過

被験者の舌背部をキット綿棒で10回擦過し、舌苔中の硫化水素を吸着させた。その場で即座にメチレンブルーテクニックにより、発色させ、吸光度を簡易型分光光度計にて測定（波長 660 nm）した。

データの解析

オーラルクロマにより測定したVSC（硫化水素、メチルメルカプタン、ジメチルサルファイド）の濃度と吸光度の値との相関関係（Pearsonの相関係数、 $p < 0.05$ ）を調べた。なお、統計解析ソフトはIBM SPSS Statistics 20）を使用した。

4. 研究成果

(1) 基礎研究

種々の硫化水素濃度におけるキット綿棒の発色状況の評価

図3のように、種々の濃度の硫化水素溶液をキット綿棒に直接吸収させた場合は、硫化水素濃度と吸光度の間に直線的な比例関係が認められた。しかし、硫化水素濃度が85 ngを超えるあたりから発色が頭打ちとなり、直線関係からはずれることが判明した。

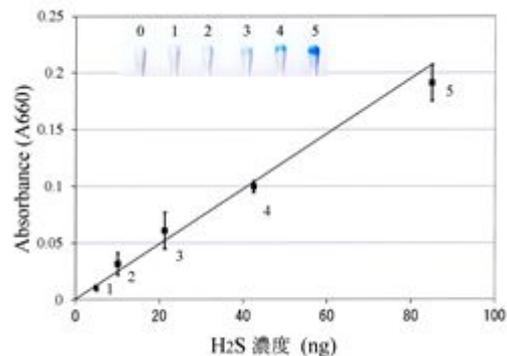


図3 キット綿棒の発色状況

種々の曝露時間におけるキット綿棒の発色状況の評価

バイアル内の気相中の硫化水素にキット綿棒を曝露させた場合、図4のように5分間の曝露で予想される発色量の11%、180分間で90%に達することが判明した。バイアル内の硫化水素濃度 230 ng の時と 460 ng の時で

はいずれの時間においても発色状況の差は認められなかった。

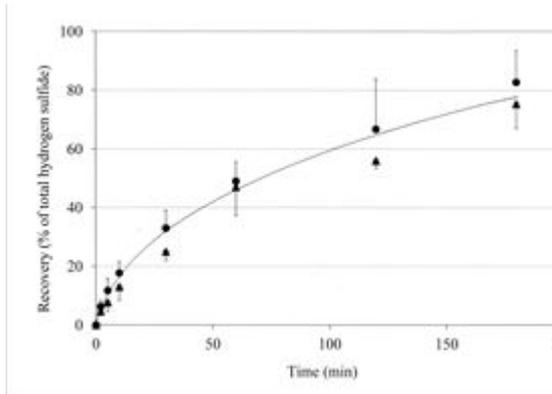


図4 キット綿棒の発色状況

(2) 臨床研究

被験者

本研究で協力の得られた被験者は、101名（男48名、女53名、年齢12~76歳、平均年齢：男42.1±14.3歳、女：男47.1±14.4歳）で、キット綿棒による発色の総件数は182件であった

各VSCと吸光度の相関

1. 硫化水素 (H₂S)

被験者の口腔内の硫化水素とメチレンブルーテクニクによるキット綿棒の発色量の間には、図5のように比較的高い相関関係が認められた ($r=0.615$, $p<0.001$)。

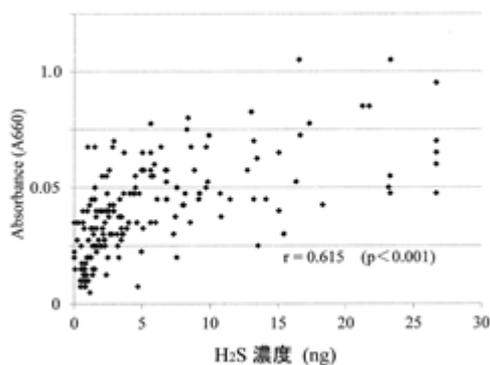


図5 キット綿棒に吸着された硫化水素濃度と発色量の関係

2. メチルメルカプタン (CH₃SH)

同様に、メチルメルカプタンとキット綿棒の発色量の間には、図6のように低い相関関係しか認められなかった ($r=0.331$, $p<0.001$)。

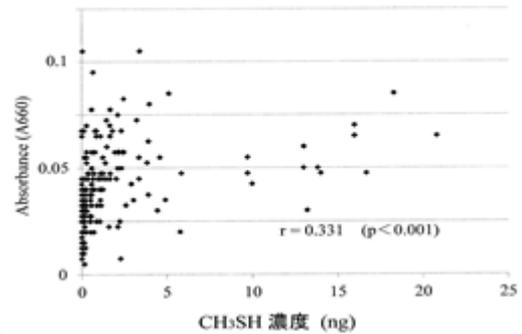


図6 キット綿棒に吸着されたメチルメルカプタン濃度と発色量の関係

3. ジメチルサルファイド ((CH₃)₂S)

同様に、ジメチルサルファイドとキット綿棒の発色量の間には、図7のように低い相関関係しか認められなかった ($r=0.334$, $p<0.001$)。

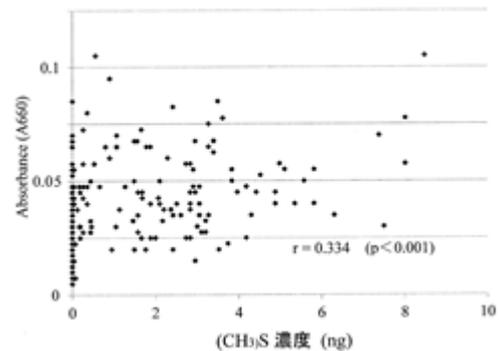


図7 キット綿棒に吸着されたジメチルサルファイド濃度と発色量の関係

4. 全VSC濃度

被験者の口腔内の全VSC（硫化水素+メチルメルカプタン+ジメチルサルファイド）とキット綿棒の発色量の間には、図8のように比較的高い相関関係が認められた ($r=0.607$, $p<0.001$)。

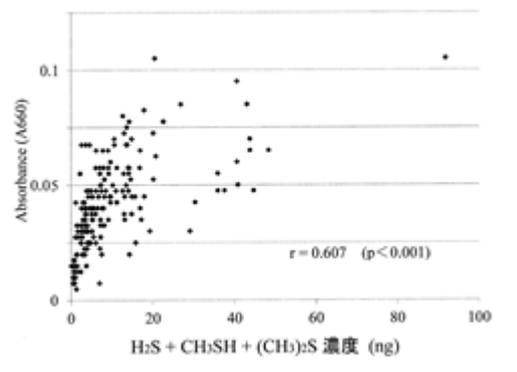


図8 キット綿棒に吸着された全VSC（硫化水素+メチルメルカプタン+ジメチルサルファイド）濃度と発色量の関係

結果のまとめと今後の課題

1. 基礎研究

今回の研究の結果から、次のことが明らかとなり、臨床研究に着手する上で貴重な知見が得られた。

i) 一定の範囲内の硫化水素濃度であれば、硫化水素の濃度に比例する発色の変化を目視できること。そのことから、口臭スクリーニング用のキット綿棒としての有効性が確認できた。

ii) 気相中の硫化水素にキット綿棒を曝露させて発色させるには、短時間では不適切であることが判明した。そのため、キット綿棒を口にくわえて口腔内のVSCを吸着させることは現実的ではなく、直接キット綿棒で舌背部を擦過し、舌苔内の硫化水素を直接吸着させることが必要であることが明らかとなった。

2. 臨床研究

今回の研究では、被験者の口腔内VSCとメチレンブルーテクニックによるキット綿棒の発色量の間には、硫化水素に比較的高い相関関係が認められた。

硫化水素が口臭の悪臭成分の多くを占めることから、舌苔を擦過し、メチレンブルーテクニックにより発色させる本法は、口臭のスクリーニング方法の1つとして有用であることが示唆された。

しかし、実用化に向けては克服しなければならない問題点がいくつか浮かび上がった。

i) 発色に至る術式が煩雑であること。

家庭でも手軽にできるキットにするには、せいぜい発色液を1回添加する程度の術式にとどめる必要がある。

本法では、発色液に加え、塩化鉄溶液、固定液を決まった時間通りに添加し、しかも発生した余計な色素をろ紙で吸収しながら、行わねばならない。これを家庭で行うには煩雑であることから、改良することが求められる。

) 発色量が足りないこと。

一般的に発色量(青)が足りない。高齢者が使用することも考えられるため、発色を増感する工夫が必要である。

) 発色に影響を及ぼす因子の解明が必要であること。

オーラルクロマで測定した口臭値がほぼ同じでも発色量が異なることが認められることから、舌背上の水分や舌苔の状態など発色に影響を与える因子の解析が求められる。

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)

Kanehira T, Hongo H, Takehara J, Asano K, Osada K, Izumi H, Fujii Y, Sakamoto W: A novel visual test for hydrogen sulfide

on the tongue dorsum, Open Journal of Stomatology, 2:314-321, 2012. (査読:有)

[学会発表](計2件)

兼平 孝、本郷博久、竹原順次、高橋大郎、本多丘人、沖野雄一郎、森田 学: 舌苔中の硫化水素定量による新しい口臭測定キットの開発、第63回日本口腔衛生学会・総会、2012年5月27日、神奈川歯科大学(横須賀市)。

兼平 孝、本郷博久、沖野雄一郎、浅野行蔵、坂本 巨、森田 学: 新しい口臭測定キットの開発 - 舌苔中の硫化水素定量による - .第56回日本唾液腺学会総会・学術大会、2011年12月3日、文京学院大学(東京)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼平 孝 (KANEHIRA TAKASHI)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号: 90194935

(2) 研究分担者

竹原 順次 (TAKEHARA JUNJI)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 60216934

森田 学 (MORITA MANABU)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 40157904

(3) 連携研究者

なし