

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462858

研究課題名(和文)口臭簡易検出キットの開発

研究課題名(英文)Development of simple oral halitosis detection kit using culture method

研究代表者

續橋 治 (TSUZUKIBASHI, Osamu)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：80333110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：口臭は成人のおよそ4人に1人に認められ、舌背に生息している細菌が産生する揮発性硫黄化合物が主に原因となる。そこで本研究は、口臭原因物質の産生メカニズムに着目し、細菌学的手法を利用した簡易でコストパフォーマンスに優れ、さらには多数の検体を同時に検査することが可能な口臭検出キットの開発を行うことを目的としている本研究は本学部倫理審査委員会に承認を得て実施された。

本研究で開発した口臭簡易検出キットは、臨床の場で応用可能であり、口臭診断において大いに貢献できることが示唆された。

また、口臭に関わる口腔細菌を培養法を用いて調査したところ、Veillonella属菌が最も関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Halitosis affects about one in four adults and frequently is caused by bacteria infecting the dorsal surface of the tongue and producing volatile sulfur compounds (VSCs). The aim of this study was to develop of the simple oral halitosis detection kit using culture method. This study was approved by the Ethics Committee of Nihon University School of Dentistry, Matsudo (EC 12-014). Halitosis was confirmed by means of organoleptic assessment and VSC levels measured using sensor gas chromatograph, ODSA-P2 (FIS, Hyogo, Japan).

It was indicated that the simple oral halitosis detection kit using culture method developed in this study is useful clinically, and can greatly contribute to the halitosis diagnosis.

Moreover, after investigating of oral bacteria concerned with halitosis, it was suggested that genus Veillonella correlated with halitosis principally.

研究分野：細菌学

キーワード：口臭 検査 検査キット 口腔細菌 VSC 硫化水素 メチルメルカプタン Veillonella

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生活レベルの向上にともなって口腔に対する美意識が高まり、白い歯やきれいな歯並びを求める人々が増えてきた。そのうえ、人々の社会的距離も狭まってきた。その結果、口臭を社会的醜悪と考えて、フレッシュできれいな息を求める人々が増えてきている。現在おこなわれている口臭測定には、官能検査法や口臭診断機器の使用などがある。官能検査法は、術者の経験や技能により正確性を欠き、また口臭診断機器は高価であり、測定時間がかかるために複数の検体を同時に検査するのは困難である。

## 2. 研究の目的

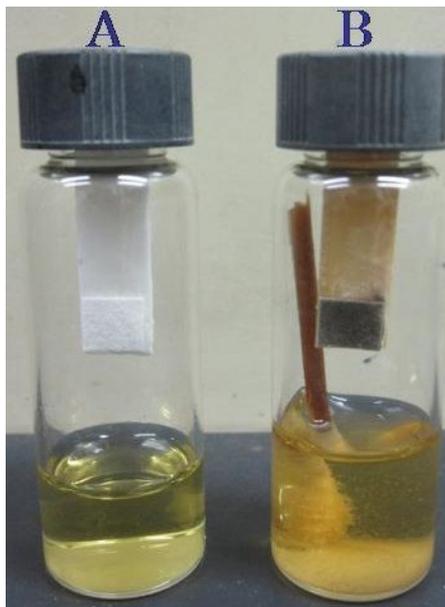
口臭は成人のおよそ4人に1人に認められ、舌背に生息している細菌が産生する揮発性硫黄化合物が主に原因となる。そこで本研究は、口臭原因物質の産生メカニズムに着目し、細菌学的手法を利用した簡易でコストパフォーマンスに優れ、さらには多数の検体を同時に検査することが可能な口臭簡易検出キットの開発を行うことを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1)本研究は、ヒトから採取した呼気および舌背試料を対象としているために、本学部倫理審査委員会に申請を行い、承認を得ている(承認番号 EC12-015)。

(2)細菌学的手法による硫化水素の検出方法(引用文献)に着目して、口臭簡易検出キットの開発を行った。本研究で開発した検出キットは、バイアル瓶に含硫アミノ酸であるシステインを添加した Trypticase soy (BBL) 液体培地 4mL を注ぎ、そこへ舌背試料を接種後、速やかに嫌気培養を行い、バイアル瓶の蓋に固定したプラスチック板に貼り付けた 1cm × 1cm 大の酢酸鉛紙が黒変するまでの時

間を測定するというものである。



口臭簡易キットの写真

A. 試料接種前

B. 舌背試料接種、培養後

(3)口臭群 50 名および無口臭群 50 名の計 100 名の被験者から呼気および舌背試料を採取した。口臭群と無口臭群の分類には、本助成金により購入した口臭測定器センサーガスクロマトグラフ ODSA-P2 (エフアイエス株式会社) を用いて被験者の呼気中の VSC (揮発性硫黄化合物) を測定することにより行った。Kazor らの報告(引用文献)を参考にし、VSC の総量が 200ppb 未満を無口臭群、また 200ppb 以上を口臭群とした。各被験者の舌背試料を用いて本口臭簡易検出キットによる測定を行い、本検出キットの有用性を確認した。

(4)口臭群と無口臭群における舌背細菌叢を比較するために、前述の舌背試料を各種選択培地に接種し、培養後に形成された集落数から CFU (colony forming unit) を算定した。使用した培地は、総菌数算定用として CDC

血液培地、総レンサ球菌用として MS 培地、*Fusobacterium* 属菌用として変法 FM 培地、*Veillonella* 属菌用として *Veillonella* 選択培地、*Porphyromonas gingivalis* 用として PGTFM 培地であった。口臭群と無口臭群における舌背細菌叢を比較検討することにより、口臭に関わる口腔細菌の特定を *in vivo* にて試みた。(5)バイアル瓶に含硫アミノ酸であるシステインとメチオニンを添加した Trypticase soy (BBL) 液体培地 4mL を注ぎ、本研究室にて保有している口腔細菌株を接種・培養後、口臭測定器センサーガスクロマトグラフを用いて VSC 量を測定することにより、口臭に関わる口腔細菌の特定を *in vitro* にて試みた。

#### 4. 研究成果

(1) 口臭群 50 名および無口臭群 50 名の計 100 名の被験者から採取し、測定された呼気中の VSC (揮発性硫黄化合物) 濃度を慢性歯周炎罹患群および健常群と分けて比較を行ったところ、メチルメルカプタン ( $p < 0.05$ ) は有意に慢性歯周炎罹患群で多く検出されたが、総 VSC 量、硫化水素およびジメチルサルファイドにおいて有意差は認められなかった (Fig.1)。慢性歯周炎罹患状況と口臭との間に相関が認められなかった。口臭群 50 名および無口臭群 50 名の VSC 量測定結果を表に示す (Table 1)。

口臭群は、無口臭群と比較して有意に総 VSCs 量、硫化水素、メチルメルカプタンおよびジメチルサルファイド濃度が高かった。これら両群から採取した舌背試料を本研究で開発した口臭簡易検出キットに接種した結果を Fig.2 に示す。

Fig.1

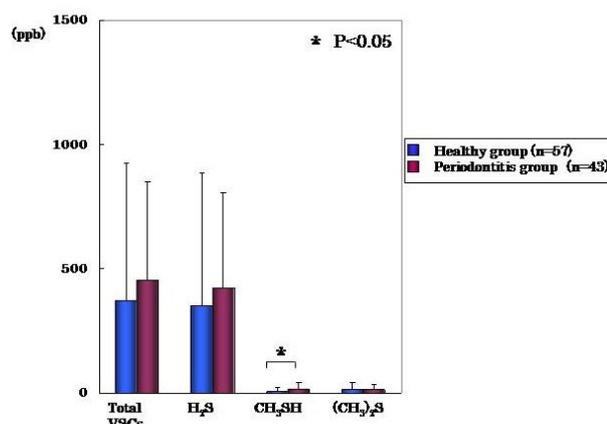
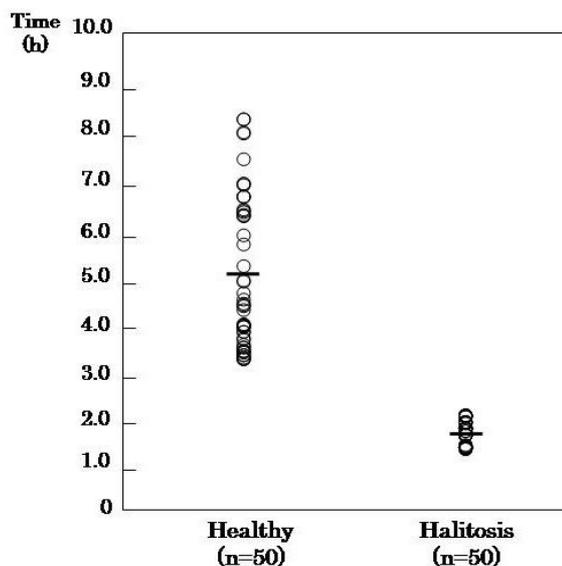


Table 1

Subject	VSCs (ppb)			
	Total	H <sub>2</sub> S	CH <sub>3</sub> SH	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S
Healthy group	64.8*	51.2**	3.8***	9.4****
Halitosis group	750.9*	712.4**	18.1***	20.5****

\*, \*\*, \*\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.05$

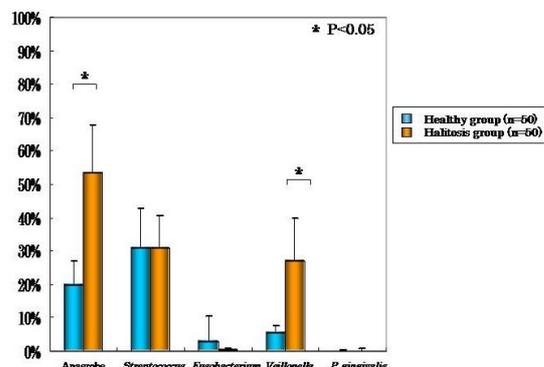
Fig.2



無口臭群において平均 1.7 時間（範囲：1.5 - 2.0 時間）で検出キットが黒変したのに対し、口臭群では平均 5.1 時間（範囲：3.3 - 8.3 時間）で検出キットが黒変した。本検出キットは明確に口臭群と無口臭群を分類することが可能であり、臨床応用できることが推察された。

(2)口臭群と無口臭群における舌背細菌叢を比較した結果を Fig.3 に示す。口臭群では総菌数に対する嫌気性菌および *Veillonella* 属菌の割合が無口臭群と比較して有意に高かった ( $P < 0.05$ )。この結果から、口臭群の舌背細菌叢における特徴は、嫌気性菌の割合が高く (53.6%)、その中でも *Veillonella* 属菌が増加 (27.2%) していることが判明した。

Fig.3



(3) 代表的な口腔細菌が産生した VSC の測定結果を Table 2 に示す。*Fusobacterium nucleatum*、*P. gingivalis*、*Prevotella nigrescens*、*Prevotella intermedia* が高い VSC 産生能を示した。そのあとに *Veillonella* 属菌が続く結果となった。前述の結果では、口臭群の舌背細菌叢では、*Fusobacterium* 属菌および *P. gingivalis* はではなく、*Veillonella* 属菌が顕著に優勢であったことを鑑みると、口臭に最も関与する口腔細菌は *Veillonella* 属菌であると推察された。

Table 2

Bacteria species	VSCs (ppb)			
	Total	H <sub>2</sub> S	CH <sub>3</sub> SH	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	32085.2	17174.7	14910.5	0
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	31708.8	15030.2	16678.6	0
<i>Prevotella nigrescens</i>	18523.2	17537.1	986.1	0
<i>Prevotella intermedia</i>	16357.6	14301.2	2056.4	0
<i>Veillonella atypica</i>	14484.5	12041.7	2442.8	0
<i>Veillonella dentocariosi</i>	11829.6	11829.6	0	0
<i>Veillonella rogosae</i>	11860.3	11860.3	0	0
<i>Veillonella dispar</i>	11679.1	11679.1	0	0
<i>Veillonella parvula</i>	11594.7	10186.7	1408.0	0
<i>Neisseria sicca</i>	10954.1	10133.0	821.1	0
<i>A. actinomycesemcomitans</i>	9673.5	8835.1	838.4	0
<i>Veillonella tobetsuensis</i>	9588.5	9588.5	0	0
<i>Tannerella forsythia</i>	6246.5	6246.5	0	0
<i>Streptococcus sanguinis</i>	4909.3	2792.1	2117.2	0
<i>Actinomyces israelii</i>	4977.5	4977.5	0	0
<i>Streptococcus salivarius</i>	3758.7	3206.5	0	0
<i>Rothia aeria</i>	3303.6	3262.8	40.8	0
<i>Actinomyces oris</i>	2727.4	440.5	2286.9	0
<i>Streptococcus oralis</i>	2577.7	2577.7	0	0
<i>Leptotrichia buccalis</i>	2048.2	1683.7	364.5	0
<i>Corynebacterium durum</i>	1753.6	541.5	1148.0	64.1
<i>Rothia dentocariosa</i>	1735.5	729.8	938.5	67.2
<i>C. matruchotii</i>	1165.5	361.3	804.2	0

< 引用文献 >

Morse ML, Weaver RH: Rapid microtechnics for identification of cultures. Hydrogen sulfide production., Am J Clin Pathol, vol.20, 1950, 481

Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, Paster BJ, Diversity of Bacterial populations on the tongue dosa of patients with halitosis and

healthy patients., J Clin Microbiol, vol.41, 1950, 558-563

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Tsuzukibashi O, Uchibori S, Kobayashi T, Umezawa K, Mashimo C, Nambu T, Saito M, Hashizume-Takizawa T, Ochiai T, Isolation and identification methods of *Rothia* species in oral cavities., J Microbiol Methods, 査読有, vol. 134, 2017, 21-26

Nambu T, Tsuzukibashi O, Uchibori S, Yamane K, Yamanaka T, Maruyama H, Wang PL, Mugita N, Morioka H, Takahashi K, Komasa Y, Mashimo C, Complete Genome Sequence of *Rothia aeria* Type Strain JCM 11412, Isolated from Air in the Russian Space Laboratory Mir., Genome Announc, 査読有, vol.4, 2016, e01444-16  
DOI: 10.1128/genomeA.01444-16

Fragkou S, Balasouli C, Tsuzukibashi O, Argyropoulou A, Menexes G, Kotsanos N, Kalfas S, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Candida albicans* in oral samples from caries-free and caries-active children., Eur Arch Paediatr Dent, 査読有, vol.17, 2016, 367-375

齋藤 真規, 桑原 紀子, 續橋 治, 小林 良喜, 平澤 正晃, 落合 智子, 歯周病原性黒色集落嫌気性桿菌群のための増殖培地の検討, 日大口腔科学, 査読有, 41 巻 3-4 合併号, 2016,

103-109

Nambu T, Tsuzukibashi O, Uchibori S, Mashimo C, Complete Genome Sequence of *Rothia mucilaginosa* Strain NUM-Rm6536, Isolated from a Human Oral Cavity., Genome Announc, 査読有, vol.3, 2015, e01122-15  
DOI: 10.1128/genomeA.01122-15

Tsuzukibashi O, Uchibori S, Kobayashi T, Saito M, Umezawa K, Ohta Mitsuhiro, Shinozaki-Kuwahara N, A selective medium for the isolation of *Microbacterium* species in oral cavities., J Microbiol Methods, 査読有, vol.116, 2015, 60-65

Tsuzukibashi O, Uchibori S, Shinozaki-Kuwahara N, Kobayashi T, Takada K, Hirasawa M, A selective medium for the isolation of *Corynebacterium* species in oral cavities., J Microbiol Methods, 査読有, vol.104, 2014, 67-71

Tsuzukibashi O, Saito M, Kobayashi T, Umezawa K, Nagahama F, Hiroi T, Hirasawa M, Takada K, A gene cluster for the synthesis of serotype g-specific polysaccharide antigen in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*., Arch Microbiol, 査読有, vol.196, 2014, 261-265

[学会発表](計5件)

小林 良喜, 橋爪 智美, 齋藤 真規, 續橋 治, 桑原 紀子, 落合 智子, Lactic acid bacteria prevent both periodontitis and

atherosclerosis , 日本細菌学会 , 2017 年 3 月 19 日 , 仙台国際センター ( 宮城県・仙台市 )

續橋 治 , 内堀 聡史 , 齋藤 真規 , 桑原 紀子 , 落合 智子 , Red complex 細菌である *P. gingivalis* および *T. forsythia* の分離法 , 日本細菌学会 , 2017 年 3 月 19 日 , 仙台国際センター ( 宮城県・仙台市 )

續橋 治 , 内堀 聡史 , 齋藤 真規 , 小林 良喜 , 瀧澤 智美 , 桑原 紀子 , 落合 智子 , *Actinomyces israelii* の分離用選択培地の開発とその口腔内分布 , 歯科基礎医学会 , 2016 年 8 月 26 日 札幌コンベンションセンター ( 北海道・札幌市 )

續橋 治 , 内堀 聡史 , 齋藤 真規 , 小林 良喜 , 桑原 紀子 , 落合 智子 , 口腔 *Rothia* 属菌選択培地の開発とその口腔内分布 , 日本細菌学会 , 2016 年 3 月 23 日 , 大阪国際交流センター ( 大阪府・大阪市 )

續橋 治 , 桑原 紀子 , 齋藤 真規 , 瀧澤 智美 , 小林 良喜 , 落合 智子 , *A.actinomycetemcomitans* 簡易検出キットの開発と臨床応用 , 歯科基礎医学会 , 2015 年 9 月 13 日 , 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター ( 新潟県・新潟市 )

〔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 :

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

續橋 治 (TSUZUKIBASHI Osamu)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号 : 80333110

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号