

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390565
 研究課題名 (和文) 植物由来プロテアーゼの舌苔除去および揮発性硫黄化合物発生抑制に関する介入研究
 研究課題名 (英文) Effects of plant-derived protease on removing tongue coatings and reducing volatile sulphur compounds in oral air.
 研究代表者
 宮崎 秀夫 (MIYAZAKI HIDEO)
 新潟大学・医歯学系・教授
 研究者番号：00157629

研究成果の概要：口臭の主な原因は舌苔（舌の上にある苔状の組織）から生ずる気体である。そのため舌苔を除去することで口臭が抑制される。本研究では植物由来のタンパク分解酵素アクチニジンによりタンパク質を多く含む舌苔が分解・除去され、口臭が減少することを検討した。結果として、アクチニジンは口の中の細菌に影響を与えることなく舌苔の量を減少させ、それに伴って口臭を減少させることが確認された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2007年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	6,800,000	2,040,000	8,840,000

研究分野：予防歯科学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：舌苔、プロテアーゼ、口臭、介入研究

1. 研究開始当初の背景

(1) 口臭の原因物質は硫化水素、メチルメルカプタン、ジメチルサルファイドなどの揮発性硫黄化合物 (volatile sulphur compounds;以下 VSC とする) であるといわれている。全口臭の 6 割は舌苔上で産生され、生理的口臭の産生は主に脱落上皮細胞、連鎖球菌、ブドウ球菌、白血球などのたんぱく質

を含む成分からなる舌苔で行われる。そのため、舌苔を生物化学的に分解・除去するためにはプロテアーゼが有効であると考えられる。舌苔の除去は舌ブラシなどによる舌清掃などの機械的清掃に限られていたが、化学的清掃を用いた除去について、キウイフルーツ由来システインプロテアーゼであるアクチニジンを用いた舌苔及び VSC の減少効果が報告されている。しかしながら、細菌叢の変

化についての報告はなされておらず、また、長期に服用することによる舌苔および口臭抑制効果についての報告もない。

(2) タンパク質分解酵素プロテアーゼを使用した舌清掃は、器具を使用した舌清掃と比較して使用方法の簡便性と高い安全性が示唆されており、特に高齢者や病者など身体機能が低下した患者が舌清掃を独力で行う際に有効であると考えられる。また、プロテアーゼは唾液中に溶解し舌乳頭間に容易に浸透するため、効果的に舌苔を除去できる可能性がある。一方で、舌苔は細菌増殖の場であり、誤嚥性肺炎のリザーバーであるといわれる。そのため、特に要介護者などは、舌苔が蓄積され過度の細菌増殖が起きないように、日常的に舌苔が除去されることが望ましい。そのために、安全かつ簡便な舌苔の付着量、VSC産生量を減少させる方法を確立する必要がある。

2. 研究の目的

(1) システインプロテアーゼの細菌叢に及ぼす影響および長期使用における舌苔および口臭抑制効果について検討することを目的とする。

(2) 要介護高齢者を対象とし、システインプロテアーゼ含有ゲルを併用した舌清掃による舌苔の減少およびVSCの産生量について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ①アクチニジンタブレット使用後の細菌叢の変化

3%アクチニジン含有タブレット(以下テス

トタブレット)とプラセボタブレットの組成を表1に示す。同組成にて重量1.0g、直径13mmのタブレットとした。アクチニジンはキウイフルーツ由来で酵素活性9,000unit/gの試料(アサヒフードヘルスアンドケア)を利用した。

表1. テストタブレットおよびプラセボの成分(%)

成分名	テスト	プラセボ
アクチニジン	3.0	-
還元バラチノース	61.8	64.8
マルチトール	33.0	33.0
ショ糖脂肪酸	2.0	2.0
アスパルテーム	0.1	0.1
微粒二酸化ケイ素	0.1	0.1
計	100	100

対象はボランティアの25-54歳の男性10名である。テストタブレット2g及びプラセボタブレット2g用いた比較試験を行った。テストタブレットを使用した測定とプラセボタブレットを使用した測定との間には少なくとも7日間の洗い流し期間を設けた。

服用前に一人の歯科医師による舌清掃を行い、続いてタブレット(1g)を2錠服用した。服用に際して、タブレットは噛まずに舌背表面に接した状態で溶解させるよう指示した。タブレットの服用前後において、滅菌綿棒にて有郭乳頭より前方の舌背全体をほぼ定圧にて擦過し、舌苔サンプルを得た。サンプルの採取は一人の検査者のみが行った。舌背から摂ったサンプルは、real-time PCRにて総口腔細菌及び歯周病関連菌(*Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola* and *Fusobacterium nucleatum*)の定量を行った。

②アクチニジンタブレット長期使用後のVSC及び舌苔の変化

対象は24-54歳(平均±標準偏差)の男性20名である。10名ずつの2グループに分け、

3%アクチニジン含有タブレットとプラセボタブレットを用いた、各7日間、計14日間の交差試験を行い、洗い流し期間は14日間とした。試験方法は二重盲検法を採用した。対象者には実験1週間前から実験期間終了までの舌清掃の禁止、VSC測定前夜より歯磨剤の使用の禁止及び実験当日の昼食後から実験開始の17時まで、口腔内清掃、飲食、喫煙の禁止を指示した。対象者は1日3回定時（11時、17時、23時）に1回につき（1）①と同様に2錠（2g）のタブレットを服用した。尚、実験初日に服用状況および副作用を記入する用紙を配布し、最終日に回収した。

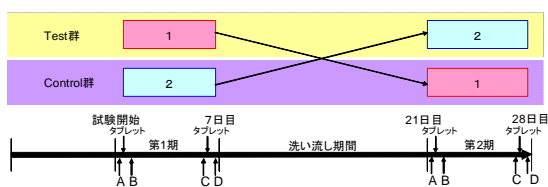


図1. 実験デザイン

タブレット服用開始直前直後及び7日間の実験期間の最終タブレット服用の直前直後（図1中、A～Dの各点）にVSC濃度測定と舌背の撮影を行った。VSC濃度の測定にはオーラルクロマ (ABILIT CORPORATION, JAPAN)を用いた。舌背の撮影は、対象者に舌をオトガイにむけて突出させて、蛍光灯下にてリングフラッシュ (SIGMA ELECTNIC FLASH MACRO EM-140 DG NA-iTTL) を光源としてデジタルカメラ (Nikon, Digital SLR Camera D200) にて同一の検査者が行った。舌苔の評価は一人の熟練した歯科医師が舌背の輪郭と舌苔と考えられる部位をパーソナルコンピュータソフトウェア ImageJ (NIH, USA) 上にてトレースして面積比を計算した。なお、タブレットの効果の及ぶと思われる範囲での評価を行うため、ソフトウェア上で口角を結んだ線を引き、それより前方を評価対象とした。

(2) 要介護者におけるアクチニジン併用舌清掃による舌苔の変化

対象は特別養護老人施設に入所している要介護者26名である。13名ずつの2グループに分け、表2に示す3%アクチニジン含有ゲルとプラセボゲルを用いた、各14日間、計28日間の交差試験とし、洗い流し期間は14日間とした。試験方法は二重盲検法を採用した。対象者は実験前1週間以上舌清掃を禁止した。介護者2名が1日1回ゲルを舌背に塗布したのち舌ブラシにて舌清掃を行った。初日、1日後および最終日の舌清掃前に舌背の写真撮影及びオーラルクロマによるVSC測定を行った。舌苔は3名の歯科医師が画像上で舌苔付着量の評価を行い、その平均値を舌苔スコアとした。

表2. 試験剤(ゲル) および偽薬の成分(%)

成分名	テスト	プラセボ
アクチニジン	3.0	-
還元パラチノース	20.0	20.0
グリセリン	77.0	80.0
計	100	100

尚、(1),(2)において、VSC濃度の比較には Paired t-test、細菌数、舌背上の舌苔面積の占める割合の比較には Wilcoxon-test を用いた。統計処理にはパーソナルコンピュータソフトウェア SPSS16.0 for Windows (SPSS Inc., USA) を用いた。

4. 研究成果

(1) ①アクチニジンタブレット使用後の細菌叢の変化

表3にアクチニジン含有タブレットおよびプラセボタブレット服用前後の口腔内細菌の変化について示す。

タブレット使用の前後において、総菌数に対する5種の歯周病原菌の割合についてい

れも有意な変化は見られなかった。この結果より、アクチニジンは VSC を産生する特定の細菌に作用して細菌叢を変化させることはないと考えられる。

表3. タブレット使用前後における口腔内細菌中の歯周病原性菌の割合(%)

歯周病原性菌	使用前		使用后		P-value*
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	
% <i>Prevotella intermedia</i>	0.002	0.004	0.002	0.005	1.000
% <i>Porphyromonas gingivalis</i>	0.008	0.022	0.004	0.014	0.125
% <i>Bacteroides forsythus</i>	0.157	0.226	0.266	0.390	1.000
% <i>Treponema denticola</i>	0.000	0.001	0.001	0.002	1.000
% <i>Fusobacterium nucleatum</i>	0.296	0.375	0.267	0.314	0.750
Test群					
% <i>Prevotella intermedia</i>	0.022	0.046	0.049	0.139	0.375
% <i>Porphyromonas gingivalis</i>	0.004	0.007	0.002	0.004	1.000
% <i>Bacteroides forsythus</i>	0.093	0.107	0.114	0.167	0.754
% <i>Treponema denticola</i>	0.000	0.001	0.000	0.000	1.000
% <i>Fusobacterium nucleatum</i>	1.064	1.603	0.487	0.582	0.508
Control群					

* Wilcoxon's Test

② アクチニジンタブレット長期使用後の VSC 及び舌苔の変化

図2に各測定点(図1中A~D)における口空气中の VSC 濃度について示す。

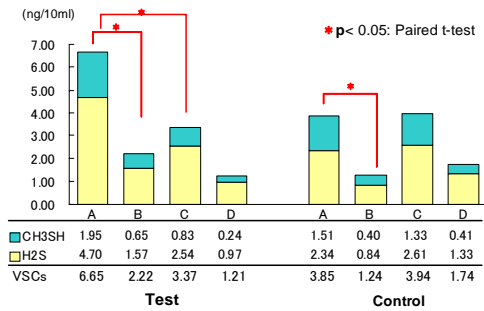


図2 各測定点における口空气中VSC濃度(ng/10ml)

1週間の服用後、平均 VSC 濃度は Test 群において 6.65 (±8.36) から 3.37 (±5.14) に有意に減少した。一方、対象群では 3.85 (±4.07) から 3.94 (±6.07) とほぼ同じ値を示した。Test 群では硫化水素は 4.70 (±6.26) から 2.54 (±4.00)、CH3SH は 1.95 (±2.46) から 0.83 (±1.46) に減少した。呼気中の硫化水素と CH3SH の割合は、1週間の服用後も、両群ともに同等であった。

表4に舌背に対する舌苔の面積の割合を示す。1週間の使用後には Test 群において減少傾向がみられるが、有意な差は見られない。しかし、ベースラインにて 20%以上の舌苔を持つもののみで比較を行うと、Test 群で有意

な舌苔の割合の減少がみられた(表5)。

表4. 舌背に対する舌苔面積の割合(N=20)

	Test (N=20)	Control (N=20)
A	20.7 ± 19.4	16.9 ± 14.4
B	15.4 ± 13.3	11.5 ± 10.4
C	16.8 ± 13.7	16.9 ± 15.1
D	11.2 ± 10.1	12.8 ± 9.8

Mean ± SD (%) * p < 0.05: Wilcoxon-test

表5. 舌背に対する舌苔面積の割合(ベースライン A点での面積割合が20%以上のもの)

	Test (N=7)	Control (N=9)
A	42.5 ± 16.2	29.7 ± 12.0
B	24.5 ± 15.7	16.7 ± 11.6
C	29.1 ± 12.1	23.9 ± 17.8
D	13.8 ± 12.7	19.1 ± 10.0

Mean ± SD (%) * p < 0.05: Wilcoxon-test

尚、ベースラインにおける VSC 濃度及び舌苔の割合に有意な差はなかった(図示なし)。両群とも最初の実験終了から次の実験開始までを14日間としたが、ベースライン時において舌苔の割合及び VSC 濃度の割合に有意な差はなかったため、洗い流し期間は十分であったと考えられる。また、配布用紙での回答では副作用は見られなかった。

1週間のタブレット使用前後において、プラセボ群では舌苔量及び VSC 量にほとんど変化は見られなかった。一方、アクチニジンを継続使用した群では VSC 量は 50%の減少が見られ、舌苔においても減少傾向にあった。また、舌苔量の多いもの(ベースラインで 20%以上の付着のあったもの)で比較を行うと、1週間の使用後に有意に減少した。この結果はシステインプロテアーゼが舌苔付着および VSC の産生に抑制的、かつ継続的に働いていることを示している。

本研究の結果では使用の直後においては Test 群、プラセボ群に関わらず舌苔及び

VSCの減少効果が認められたためアクチニジンによる減少効果とは言えないが、同酵素の短期使用（服用前後）における舌苔面積及びVSC濃度減少についての報告、その効果の蓄積があると考えられる。

なお、本研究の結果で短期使用前後の舌苔除去効果に有意差が確認できなかったのは、タブレットという形態のため、舌の上でなめる場合に機械的刺激となり舌苔の減少があったためと考えられる。

(2) 要介護者におけるアクチニジンゲル併用舌清掃による舌苔の変化

表6にゲルを用いた舌清掃を継続して行った場合の舌苔スコアの変化について示す。

表6. ゲル併用舌清掃時の舌苔スコア

		パーセンタイル			平均値	標準偏差	
		25	50	75			
Test群	初日	2.00	2.50	3.00	2.33	0.52	P=0.047 [#]
	1日後	2.00	2.50	3.00	2.33	0.59	
	14日後	1.50	2.00	2.00	1.80	0.65	
Control群	初日	2.00	2.50	2.50	2.30	0.56	
	1日後	2.00	2.00	2.50	2.23	0.50	
	14日後	2.00	2.00	2.50	2.10	0.60	

#: Wilcoxon's Test

舌苔スコアは14日間の使用後、Test群にて平均値2.33から1.80に有意(p=0.047)に減少したが、Control群では2.30から2.10に減少したのみであった。これはアクチニジンによる舌苔中タンパク質の分解により、舌背に対する舌苔の付着力が弱化し、舌ブラシによって容易に除去できる環境となったためであると考えられる。VSC濃度についてはいずれの群も差がなかった(図示なし)が、対象者の身体的制約によりサンプルの採取が十分に行えず、評価が難しかったため参考に留まる。以上より、アクチニジン含有ゲル併用舌清掃による舌苔減少が確認された。この結果は誤嚥性肺炎の予防などに舌清掃が重要になる介護の場において、アクチニジン含有ゲルが舌清掃の効果を高める補助材としての役割を果たすことができることを示唆している。

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)

- ① 吉松大介, 杉村真司, 井岡俊之, 白石浩荘, 米谷俊, 山賀孝之, 宮崎秀夫: プロテアーゼ含有タブレットの口臭抑制効果, 口腔衛生会誌, 57: 22-27, 2007. 査読有.

[学会発表] (計4件)

- ① 濃野 要, アクチニジンタブレット長期服用による口臭抑制効果, 第57回日本口腔衛生学会・総会, 2008年10月2日~4日, さいたま(埼玉)
- ② H. MIYAZAKI, Products for breath odor control, 5th Conference of Asian Society for Breath Odor Research, 2008年5月6日, バンコク(タイ)
- ③ K. NOHNO, Cysteine protease reduces tongue coating and volatile sulfur compounds. 第85回 International Association for Dental Research (IADR) 総会, 2007年3月21日~24日, ニューオーリンズ(アメリカ)
- ④ H. MIYAZAKI, Effects of protease extracted from a plant on reduction of both tongue coating and VSCs. The 3rd Conference of Asian Association for Breath Odor Research (ASBOR), 2006年11月28日, 岡山(岡山)

[その他]

- ① 濃野要, 宮崎秀夫, 山賀孝之: Clinical Report/プロテアーゼを用いた口臭ケア・舌苔ケアのアプローチ, Dental Magazine, 125: 50-53, 2008.
- ② 宮崎秀夫: TRENDS, プロテアーゼによる舌苔除去・口臭予防, Dental Magazine, 122: 62-66, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 秀夫 (MIYAZAKI HIDEO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00157629

(2) 研究分担者

山賀 孝之 (YAMAGA TAKAYUKI)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：90345512

金子 昇 (KANEKO NOBORU)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00397126

濃野 要 (NOHNO KANAME)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：80422608