

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19012

研究課題名（和文）シアリダーゼのムチン分解による生理的口臭産生の基礎的検討

研究課題名（英文）Basic study of physiological halitosis production by mucin decomposition of sialidase

研究代表者

岩村 侑樹 (Iwamura, Yuki)

愛知学院大学・歯学部・歯学部研究員

研究者番号：90783035

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：P. gingivalisによるムチン分解系にシアリダーゼ、シアリダーゼインヒビター、ガラクトシダーゼ等の試薬を加えて、4時間、37℃インキュベートした。その後、硫化水素、メチルメルカプタン、ジメチルサルファイドの3種類のガス濃度測定と、CBB染色、PAS染色によるムチンの分解程度を確認を行った。

硫化水素、メチルメルカプタン濃度がシアリダーゼ+ガラクトシダーゼ追加群と他の群との間に有意な違いが認められた。CBB染色では試薬添加によるムチン分解程度の変化が認められなかった。PAS染色では4時間インキュベート時にシアリダーゼの添加によりムチン分解が進んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、治療困難な生理的口臭を発生させる基質として唾液中のムチンは注目されているが、発生経路は複雑で未だ不明な点も多く、より詳細な検討が求められている。本研究で得られた成果は、まだ十分検討されていないため、継続的な研究が必要であるが、唾液中に含まれるシアリダーゼが、ムチン代謝を促進し、口臭産生に与する可能性が示唆された事は、口臭の発生メカニズムの理解を促し、将来の、口臭抑制に有効な手段の開発につながるのではないかと考えている。

研究成果の概要（英文）：Reagents such as sialidase, sialidase inhibitor, and β -galactosidase were added to the mucin-degrading system by P. gingivalis, and the mixture was incubated at 37 °C for 4 hours. After that, three types of gas concentrations of hydrogen sulfide, methyl mercaptan, and dimethyl sulfide were measured, and the degree of mucin decomposition by CBB staining and PAS staining was confirmed.

Significant differences in hydrogen sulfide and methyl mercaptan concentrations were observed between the sialidase + β -galactosidase addition group and the other groups. CBB staining showed no change in the degree of mucin decomposition due to the addition of reagents. In PAS staining, mucin degradation proceeded due to the addition of sialidase during incubation for 4 hours.

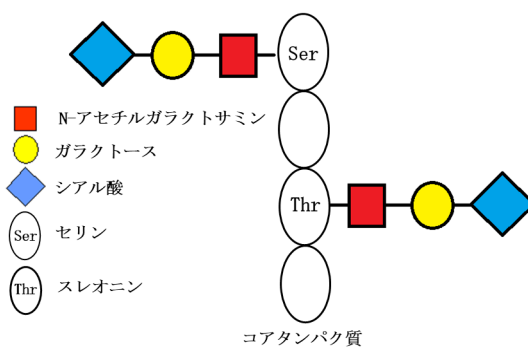
研究分野：歯周病学

キーワード：口臭 シアリダーゼ ムチン

1. 研究開始当初の背景

生理的口臭は発生源となる疾患や器質的变化がなく、生理的に発生する口臭である。生理的口臭を発生させる基質は口腔内に存在するタンパク質で、これまでは主に「舌苔」と言われていた。しかし、舌苔の付着がないのにも関わらず、生理的口臭を有する口臭患者は数多く存在し、治療困難なことが多い。近年、治療困難な生理的口臭を発生させる基質として注目されているのが、唾液中に含まれる粘性物質のムチンである。

唾液中のムチンと口臭との関連は以前から研究されているが、その発生経路は複雑で未だ不明な点も多く、より詳細な検討が求められている。口腔内に存在する MUC5B と MUC7 の 2 種類のムチンは、口腔内を潤滑にして乾燥を防ぎ、口腔粘膜を保護するとともに抗菌作用を持つ生体防御物質であり、コアタンパク質にあるセリンまたはスレオニン残基の OH 基に O-グリコシド結合で糖が多数結合した、化学的に安定な分子である(図 1)



ムチンをはじめ、口腔内に供給されるタンパク質の多くは糖タンパク質である。それを細菌が代謝し VSC 産生へ至るためには、「糖タンパク質からの糖の除去 タンパク質の分解によるペプチドやアミノ酸の供給 アミノ酸代謝による VSC 産生」というステップを経る必要があり、ムチン分解による口臭の発生においても、糖鎖分解は、ジンジパイン等のタンパク分解酵素によりタンパク質分解を促進させる重要なステップである。

口腔細菌によるムチン糖鎖の分解と口臭発生の関係については、β-ガラクトシダーゼに関連した研究がいくつか報告されてきた。研究代表者らの研究室では、ムチンの糖鎖分解に関わる因子の検索を行ったところ、口腔細菌由来のシアリダーゼによるシアル酸の切断が鍵となる可能性があるとの着想に至った。そして、シアリダーゼにより VSC 産生菌によるムチン代謝が進むことにより口臭産生が促進されるのではないかと考えた

そこで、若年層の唾液シアル酸濃度の日内変動と生理的口臭について調査したところ、唾液中シアル酸には日内変動が認められ、結合シアル酸濃度は口臭と負の相関があり、遊離シアル酸率には正の相関傾向を認めた(図 2)。このことからシアル酸の切断が口臭の発生過程に重要なステップとなる可能性があることが示された(第 6 回日本口臭学会学術大会で報告)

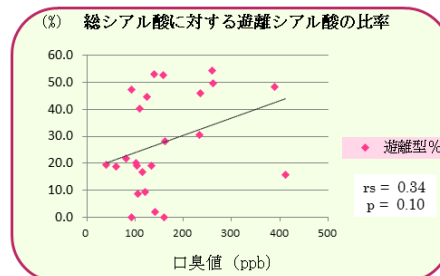
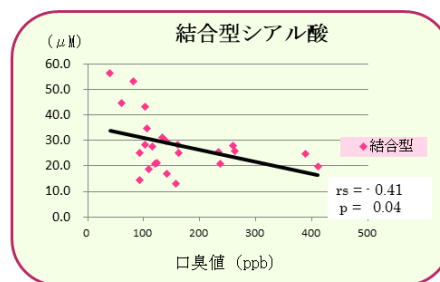


図 2 シアル酸と口臭値の関連

2. 研究の目的

研究代表者らの研究室での臨床研究での検討結果をより詳細に検討するため、実際にシアリダーゼがムチンを分解し、口臭ガスを産生する過程を直接的に観察する必要があると考えた。そこで、ムチンの基礎研究によく用いられる豚ムチンを用いた *in vitro* での実験系から、シアリダーゼがムチン分解による口臭産生にどのように関与しているかを検証することとした。

3. 研究の方法

(1) 豚ムチン溶液の作製

滅菌 PBS に豚ムチンを 1mg/ml の濃度となるように溶解し、4 overnight で攪拌し、溶解させた。その後、0.22 μ m シリンジフィルターにてろ過滅菌を行い、4 嫌気状態で保存し、各種研究に 1ml 使用した。

(2) 各種酵素の調整

シアリダーゼは 100Unit/ml になるように pH4.5 酢酸ナトリウム溶液を用いて調整した。ムチン溶液には 100 μ l 添加した。

シアリダーゼインヒビターは 50mM/ml になるように PBS を用いて調整した。ムチン溶液には 100 μ l 添加した。

-ガラクトシダーゼは 2.5mg/ml になるように PBS を用いて調整した。ムチン溶液には 100 μ l 添加した。

(3) *P. gingivalis* の調整

P. gingivalis (ATCC33277 株) を液体培地で対数増殖期になるまで培養し、遠心分離後に上清を除去し、PBS を用いて 10⁸CFU/ml に調整した。ムチン溶液には 100 μ l 添加した。

(4) ムチン分解状態の調査

シアリダーゼ、シアリダーゼインヒビターがムチンの分解状態にどの程度関与について調査する事を目的として、ムチン + *P. gingivalis* 混合溶液にシアリダーゼ、シアリダーゼインヒビター、シアリダーゼ + シアリダーゼインヒビターを添加した群とムチン単独、ムチン + *P. gingivalis* の計 5 群で比較検討を行った。どの程度の速度で分解するのかを確認する為、ムチン混合溶液を 4 時間、24 時間 37 でインキュベートした。その後、サンプルの一部を用いて 90 分 100V の条件でポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)を実施した。泳動したゲルを糖タンパク染色 (PAS 染色) し、ムチンの分解状況を検討した。

(5) 口臭ガス産生量の測定

シアリダーゼ、シアリダーゼインヒビターがムチン分解を促進する事で、口臭ガスの産生量にどの程度関与するのか、また -ガラクトシダーゼとの相互作用でさらに口臭産生が促進されるのかを調査する事を目的として、ムチン + *P. gingivalis* 混合溶液にシアリダーゼ、シアリダーゼ

インヒビター、 α -ガラクトシダーゼのうちそれぞれ1種類のみ酵素を添加する群、シアリダーゼ+ α -ガラクトシダーゼ添加群、シアリダーゼインヒビター+ α -ガラクトシダーゼ添加群を作製した。また、コントロール群としてムチン単独、*P. gingivalis*単独を作製し、計8群で比較検討を実施する事とした。

ムチン混合溶液を4時間、37℃でインキュベートした。その後、ガラス管のヘッドスペースのガスをシリンジで1ml吸引し、簡易型ガスクロマトグラフィー(Oral Chroma)にかけ、VSC濃度(硫化水素、メチルメルカプタン、ジメチルサルファイド)を測定し、口臭ガス産生への関与を検討した。

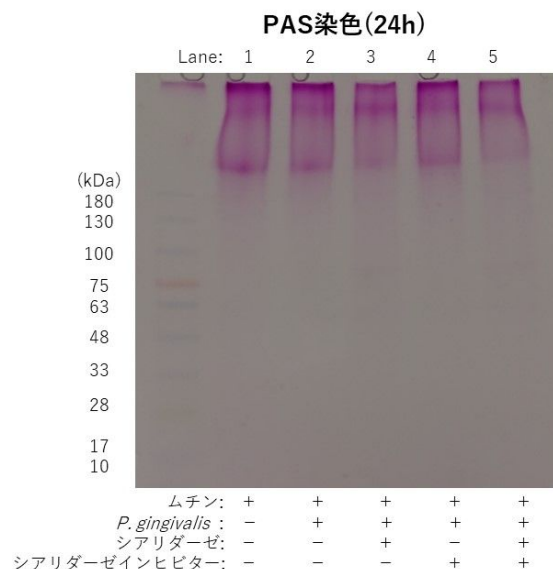
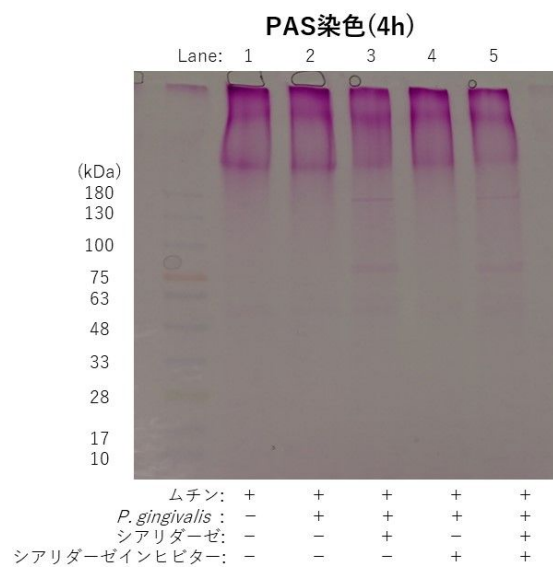
4. 研究成果

(1)ムチン分解状態の調査

4時間インキュベートしたサンプルをPAS染色したゲルを観察すると、シアリダーゼを追加した群サンプルでは80kDaと160kDa付近にバンドの出現を認めた。シアリダーゼ自体の分子量は88kDaであるため、シアリダーゼが未消化なため出現したと考えられる。また、竹原らはMUC7の分子量は130-180kDa程度と報告しており、今回の結果とも一致していた。全てのサンプルで180kDaより高分子量のはっきりとしたバンドが2個(分子量少ない順にA、Bとする)確認できるが、ムチン+*P.*

*gingivalis*群と比較するとシアリダーゼを追加した群ではAのバンドが6.5~8.5%の減少を認めた。

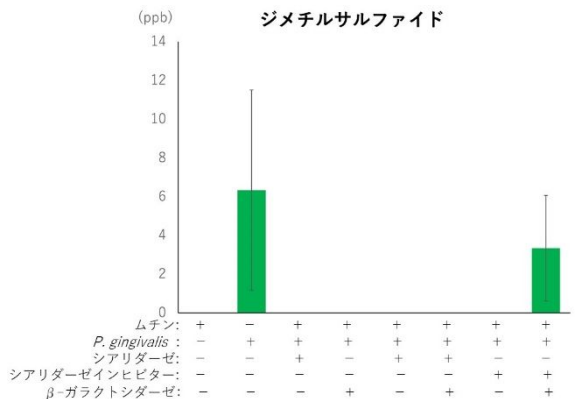
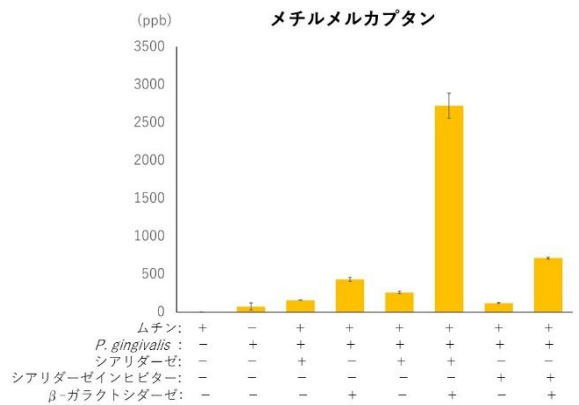
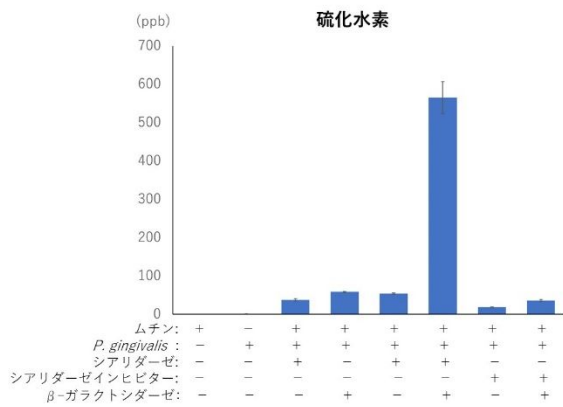
24時間インキュベートしたサンプルをPAS染色したゲルを観察すると、80kDaと160kDa付近のバンドは全ての群で認められなかった。これは24時間でシアリダーゼが十分に消化されたのと、MUC7も*P. gingivalis*が持つプロテアーゼの作用により分解された為と考えられる。また、24時間インキュベートした為、ムチン+*P. gingivalis*群と比較するとシアリダーゼを追加した群ではAのバンドが12.7~20.4%の減少を認めた。



(2)口臭ガス産生量の測定

ムチン + *P. gingivalis* + シアリダーゼ + -
 ガラクトシダーゼは他の群と比較して硫化水素濃度およびメチルメルカプタン濃度が有意に高値であった。一方、ムチン + *P. gingivalis* にシアリダーゼを追加する事での口臭ガス産生量の有意な増加は認められなかった。また、ジメチルサルファイド濃度は各群間で有意な差を認めなかった。

この結果は、4時間のインキュベートではシアリダーゼと -ガラクトシダーゼの相互作用により口臭ガス産生が促進されるが、シアリダーゼ添加のみでは口臭ガス産生するまでのムチン分解の促進が認められない事を示唆している。なお、24時間インキュベートして同様の研究を実施したが、雑ガスおよび水蒸気の発生により、硫化水素およびメチルメルカプタンの正確な測定が困難であった。今後、ガスクロマトグラフィーによりさらに詳細な検討を行う必要があると考えている。



以上の結果からシアリダーゼ追加によりムチン分解が促進し、シアリダーゼと -ガラクトシダーゼの相互作用により、口臭ガス産生が促進する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 岩村侑樹、林潤一郎、三谷章雄、柳千登勢、高橋枝里、村上多恵子、佐藤聡太、藤村岳樹、佐々木康行、御子柴茂太、福田光男	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 愛知学院大学歯学部附属病院口臭治療科における口臭症患者の動向とエゴグラムの分析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本口臭学会会誌	6. 最初と最後の頁 39-46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩村侑樹、林潤一郎、村上多恵子、藤村岳樹、高橋枝里、佐々木康行、御子柴茂太、嶋崎義浩、三谷章雄、福田光男
2. 発表標題 ムチン分解による揮発性硫黄化合物産生に対するシアリダーゼの影響
3. 学会等名 日本口臭学会10周年記念大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩村侑樹、村上多恵子、橋本洋子、林潤一郎、高橋枝里、柳千登勢、佐藤聡太、藤村岳樹、佐々木康行、御子柴茂太、嶋崎義浩、三谷章雄、福田光男
2. 発表標題 若年層における唾液シアル酸濃度の日内変動と生理的口臭との関連について
3. 学会等名 第14回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 福田光男、林潤一郎、村上多恵子、岩村侑樹、御子柴茂太、吉野京子、柳千登勢、林志穂	4. 発行年 2021年
2. 出版社 クインテッセンス出版	5. 総ページ数 112
3. 書名 歯科医院でもできる 口臭ケア	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------