

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792532

研究課題名(和文) 口腔レンサ球菌による唾液ムチン分解が口臭物質の発生機構におよぼす影響

研究課題名(英文) The effects of the degradation of mucin by Streptococci on the mechanism of oral malodor

研究代表者

谷口 奈央 (TANIGUCHI, NAO)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60372885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：口臭患者の唾液中の β -galactosidase 活性を定量解析し、歯周病由来口臭群と生理的口臭群に分類して検証した。 β -galactosidase 活性は生理的口臭群における口臭測定値、舌苔付着量およびプラーク付着量と相関を示した。次に口臭に関連する細菌構成を明らかにするために、口臭患者の唾液中の細菌叢を網羅的に解析し、口臭物質の重要な2成分である硫化水素とメチルメルカプタンのそれぞれの産生に強く関わる口腔内フローラの特徴を明らかにした。口臭の主な発生源は「舌苔」であるため、口臭患者の舌苔を採取し、舌苔の β -galactosidase 活性を調べた。

研究成果の概要(英文)：Salivary β -galactosidase activity from the patients complaining of halitosis was measured and compared between the periodontally healthy group and the periodontitis group. Positive correlations were observed between the β -galactosidase activity and oral malodor levels in the periodontally healthy group. Concerning the clinical parameter, the plaque index and tongue coating score were positively correlated with β -galactosidase activity in the periodontal healthy group. Next, the bacterial compositions of saliva exhibiting higher and lower malodor were explored in order to determine the specific microbial community related to oral malodor. In addition, the compositions of oral microbiota associated with high hydrogen sulfide and methyl mercaptan production were determined. Tongue coating is main sources of oral malodor, and therefore the β -galactosidase activity of tongue coating was measured.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：社会系歯学

キーワード：揮発性硫黄化合物 口腔内細菌叢 口臭 高速シーケンス解析 グルコシダーゼ 唾液 β -galactosidase

1. 研究開始当初の背景

口臭の主な原因である揮発性硫黄化合物 (volatile sulfur compound, VSC) は、口腔内の嫌気性菌による含硫アミノ酸の代謝産物である。含硫アミノ酸の供給源のひとつとして、唾液ムチン由来タンパクの重要性が示唆されているが、ムチンから揮発性硫黄化合物が発生するまでの過程はほとんどわかっていない。これまでに口腔レンサ球菌 *Streptococcus salivarius* で前処理したブタの胃ムチンに高い VSC 産生能を有する *Porphyromonas gingivalis* を添加すると官能検査値やハリメーター値が増加し、*S. salivarius* を β -galactosidase に置き換えても類似の変化がみられたことから、本菌の β -galactosidase の口臭発生への関与が報告されている (Sterer N and Rosenberg M *J Dent Res* 2006;85:910-914)。また、唾液の β -galactosidase 活性が、口臭評価値と正の相関性があることも報告されている (Sterer *et al. J Dent Res* 2002;81:182-185)。これらの研究では口臭の評価に主観的評価と簡易口臭測定器が利用されていたため、申請者らはガスクロマトグラフィーを利用して実際の口臭患者を対象に、唾液の β -galactosidase 活性と VSC 濃度、口腔内所見との関連性を調べた (Yoneda *et al. J Breath Res* 2010;4:017108)。その結果、 β -galactosidase 活性と VSC は正の相関関係にあることが明らかになった。さらに興味深いことに、 β -galactosidase 活性は歯周ポケットや歯周病細菌との間に相関性はなく、舌苔付着量との間に強い相関性が認められた。このことは、唾液中の β -galactosidase が口腔疾患を持たない生理的口臭における VSC 産生に深く関与していることを示唆する。

2. 研究の目的

口臭発生に係る口腔内常在菌の役割を明らかにすることを目的とし、口腔レンサ球菌の β -galactosidase 活性と口腔内状態および口臭レベルとの関連性の解析、主要な口腔レンサ球菌による β -galactosidase 活性の評価、口臭患者の唾液や舌苔の細菌叢解析をおこなった。

3. 研究の方法

1) 唾液中の β -galactosidase 活性の定量解析と口臭および口腔内状態との関連

口臭患者 56 名より唾液中を採取し、唾液中の β -galactosidase 活性を定量解析し、歯周病由来口臭群 (24 名) と生理的口臭群 (32 名) に分類して検証した。生理的口臭群には仮性口臭も含めた。口臭検査 (官能検査、ガスクロマトグラフィー解析)、口腔内診査 (歯式、口腔清掃状態、歯周組織検査、舌苔付着量、唾液検査)、唾液中細菌の定量解析 (全菌数、主要な歯周病原細菌である *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*,

β -galactosidase 活性を持つ口腔レンサ球菌である *S. salivarius*) を行い、 β -galactosidase 活性との関連性を調べた。

2) 唾液の細菌構成と口臭との関連～硫化水素型とメチルメルカプタン型～

口臭物質の中でも重要な 2 成分である硫化水素 (H_2S) とメチルメルカプタン (CH_3SH) のそれぞれの産生に強く関わる口腔内細菌を特定するために、重篤な口臭患者のうち呼気中の CH_3SH / H_2S 濃度比が極端に高いあるいは低い被験者 30 名 (H_2S 高産生型 14 名、 CH_3SH 高産生型 16 名) について、両者がともに低い被験者 13 名をコントロールとして唾液中の細菌構成を解析した。細菌構成の決定には 16S rRNA 遺伝子を利用した barcoded pyrosequencing 法を用いた。

3) 口腔レンサ球菌の β -galactosidase 活性と局在の検討

唾液を超遠心分離し上清と沈殿にわけ、酵素の局在を調べた。また 8 種のグラム陽性菌標準菌株 (*S. salivarius* GTC 0215, *S. mutans* JCM 5705, *S. sanguinis* ATCC 10556, *S. gordonii* DL1, *S. gordonii* ATCC 10558, *S. gordonii* ATCC 49818, *S. mitis* ATCC 903, *S. oralis* ATCC 10557) の培養液について対数増殖期における β -galactosidase 活性を測定した。

4) 舌苔の β -galactosidase 活性と口臭の関係

唾液の細菌構成は舌苔の細菌構成を反映するといわれているが、口臭の主な発生源は「舌苔」である。そこで、口臭患者より舌苔を採取し、舌苔の β -galactosidase 活性、口臭検査値、湿重量、口腔内所見の関連性について検討した。舌苔は舌ブラシ (モリタ) を用いて可及的に採取し 10 mL の PBS に懸濁した。1 mL を遠心し湿重量を記録した。また懸濁液の酵素活性を測定した。

4. 研究成果

1) 唾液中の β -galactosidase 活性の定量解析と口臭および口腔内状態との関連

口臭検査値は 2 群間で違いはみられなかった。しかしながら生理的口臭群では、唾液中の β -galactosidase 活性と口臭検査値の間に正の相関が認められた。これに対して歯周病由来口臭群では、酵素活性と口臭検査値に相関はみられなかった。生理的口臭群では、 β -galactosidase 活性は舌苔スコアおよびプラーク付着指数に相関を示した。また β -galactosidase 活性を持つことが知られる口腔内常在菌である *S. salivarius* と全菌数は、生理的口臭群において β -galactosidase 活性と正の相関を示した。

2) 唾液の細菌構成と口臭との関連～硫化水素型とメチルメルカプタン型～

細菌群集類似度指標 UniFrac を用いた解析によって、 H_2S 高産生型と CH_3SH 高産生型の細菌構成は系統的に異なっていることが示された。すべての群において *Streptococcus* は最も高い割合で存在した。しかしながら H_2S 高産生群と CH_3SH 高産生群はともに *Streptococcus*、*Granulicatella* の存在比率が口臭の低いコントロール群に比べて有意に低く、一方で *Neisseria*、*Fusobacterium*、*Porphyromonas*、SR1 は H_2S 群で、*Prevotella*、*Veillonella*、*Atopobium*、*Megasphaera* は CH_3SH 群で特徴的に優勢であった。本研究結果によって、 H_2S 高産生型と CH_3SH 高産生型の二種類の口臭関連口腔細菌フローラの特徴が明らかになった (図参照、論文 8 より引用)。

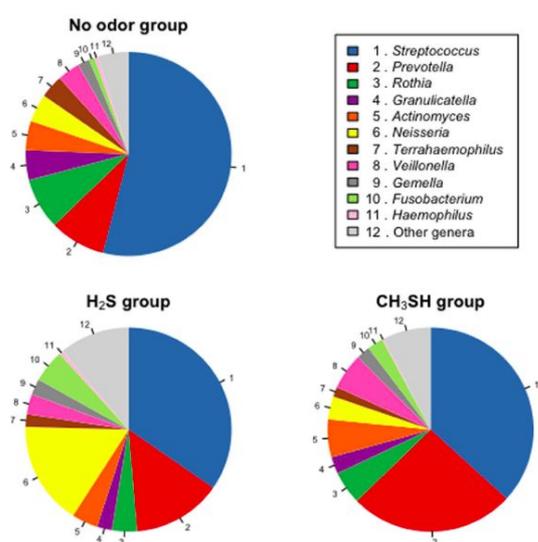


図. 口臭のない群、 H_2S 高産生群、 CH_3SH 高産生群における細菌の構成。

3) 口腔レンサ球菌の β -galactosidase 活性と局在の検討

上清成分と沈殿成分の β -galactosidase活性を測定した結果、沈殿成分に活性があり上清成分には活性がみられず、本酵素活性は菌体の表面に存在することがわかった。

口腔レンサ球菌標準菌株の培養液について、対数増殖期の β -galactosidase活性を測定したところ、いずれも0.5~0.9 units/mLの範囲で活性を示し、*S. mitis* ATCC 903株が最も強い活性を示した (0.9 units/mL)。

4) 舌苔の β -galactosidase 活性と口臭の関係

まだ十分な目標症例数に達していないが、舌苔の β -galactosidase 活性は舌苔の湿重量と正の相関があり、舌の保湿度との間に負の相関があると思われた。現在、高速シーケンス解析を用いて β -galactosidase 活性と関係のある舌苔内細菌あるいは細菌叢の同定を行っているところである。

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 13 件)

1. Suzuki N, Yoneda M, Haruna K, Masuo Y, Nishihara T, Nakanishi K, Yamada K, Fujimoto A, Hirofuji T. Effects of S-PRG eluate on oral biofilm and oral malodor. Archives of Oral Biology, 2014, 59(4):407-413. doi:10.1016/j.oooo.2013.12.400.
2. Suzuki N, Yoneda M, Tanabe K, Fujimoto A, Iha K, Seno K, Yamada K, Iwamoto T, Masuo Y, Hirofuji T. *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets for the treatment of oral malodor: a double blind, randomized, placebo-controlled crossover trial. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, 2014, 117(4):462-470. doi:10.1016/j.oooo.2013.12.400.
3. Nakano Y, Takeshita T, Kamio N, Shiota S, Shibata Y, Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T, Yamashita Y. Supervised machine learning-based prediction of oral malodor based on the microbiota in saliva samples. Artificial Intelligence in Medicine, 2014, 60(2014):97-101. doi:10.1016/j.artmed.2013.12.001.
4. Iha K, Suzuki N, Yoneda M, Takeshita T, Hirofuji T. Effect of mouth cleaning with hinokitiol-containing gel on oral malodor: a randomized, open-label pilot study. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, 2013, 116(4):433-439. doi:pii:S2212-4403(13)00276-9.10.1016/j.oooo.2013.05.021.
5. Yoneda M, Kashio N, Uchida H, Suzuki N, Matsuura H, Naito T, Koga C, Yasukochi H, Matsuura M, Hirofuji T. Awareness among dental hygienists with regard to treatment options for halitosis. International Journal of Clinical Preventive Dentistry, 2012, 8(3):173-179.
6. Yoneda M, Suzuki N, Masuo Y, Fujimoto A, Iha K, Yamada K, Iwamoto T, Hirofuji T. Effect of S-PRG eluate on biofilm formation and enzyme activity of oral bacteria. International Journal of Dentistry, 2012, ID814913, 6 pages, doi:10.1155/2012/814913.
7. Suzuki N, Tanabe K, Takeshita T, Yoneda M, Iwamoto T, Oshiro S, Yamashita Y, Hirofuji T. Effects of oil drops containing *Lactobacillus salivarius* WB21 on periodontal health and oral microbiota producing volatile sulfur compounds. Journal Breath Research, 2012, 6(1):017106. doi:10.1088/1752-7155/6/1/017106.

8. Takeshita T, Suzuki N, Nakano Y, Yasui M, Yoneda M, Shimazaki Y, Hirofuji T, Yamashita Y. Discrimination of the oral microbiota associated with high hydrogen sulfide and methyl mercaptan production. *Scientific Reports*. 2012, 2:215. doi:10.1038/srep00215.
 9. Masuo Y, Suzuki N, Yoneda M, Naito T, Hirofuji T. Salivary β -galactosidase activity affects physiological oral malodor. *Archives of Oral Biology*, 2012, 57(1):87-93. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.07.015.
 10. Yoneda M, Suzuki N, Mocado SM, Fujimoto A, Iha K, Koga C, Matsuura M, Hirofuji T. The variable etiology of oral pathologic halitosis: a case series. *Smile Dental Journal* 7 (3) 50-56, Sep 2012.
 11. Yoneda M, Suzuki N, Macedo SM, Anan H, Hirofuji T. Confusing Endodontic cases: case series report. *Smile Dental Journal* 6 (2) 26-31, Aug 2011.
 12. Suzuki N, Yoneda M, Hatano Y, Iwamoto T, Masuo Y, and Hirofuji T. *Enterococcus faecium* WB2000 inhibits Biofilm Formation by Oral Cariogenic Streptococci. *International Journal of Dentistry* 2011, 2011:834151, 5 pages, doi:10.1155/2011/834151.
 13. Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T. Mixed red-complex bacterial infection in periodontitis. *International Journal of Dentistry*. 2013 2013:587279. doi:10.1155/2013/587279.
- 〔学会発表〕(計 21 件)
1. 岩元知之、鈴木奈央、米田雅裕、山田和彦、榎尾陽介、藤本暁江、伊波幸作、瀬野恵衣、廣藤卓雄、プロバイオティクスを用いた口腔疾患の予防管理への取り組み、*歯科人間工学会* (名古屋市) 11.22-23, 2013.
 2. 春名一人、鈴木奈央、米田雅裕、山田潤一、榎尾陽介、西原哲世、仲西宏介、山田和彦、岩元知之、藤本暁江、伊波幸作、瀬野恵衣、安 忠大、入江丹佳子、廣藤卓雄、S-PRG 溶出液が口腔バイオフィームと口臭に及ぼす阻害作用、*日本歯科保存学会* (秋田市) 10.17-10.18, 2013.
 3. Suzuki N, Yoneda M, Tanabe K, Fujimoto A, Iha K, Seno K, Iwamoto T, Yamada K, Masuo Y, Haruna K, and Hirofuji T. Improvement of oral malodor using *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets, WCPD (Budapest) 10.9-12, 2013.
 4. 伊波幸作、鈴木奈央、米田雅裕、山田和彦、岩元知之、榎尾陽介、藤本暁江、瀬野恵衣、春名一人、安 忠大、入江丹佳子、西原哲世、仲西宏介、廣藤卓雄、ヒノキチオール配合ジェルを用いた口腔ケアが口臭及び口腔内環境に与える影響、第 138 回日本歯科保存学会春季学術大会 (福岡市) 6.27, 28, 2013.
 5. 中野善夫、鈴木奈央、米田雅裕、廣藤卓雄、横瀬勝美、桑田文幸、ヒト口腔内細菌叢の構成に対する亜鉛イオンの影響、第 85 回日本生化学会大会 (福岡市) 12.14-16, 2012.
 6. 榎尾陽介、鈴木奈央、米田雅裕、安 忠大、仲西宏介、藤本暁江、伊波幸作、瀬野恵衣、山田和彦、岩元知之、廣藤卓雄、S-PRG 溶出液と S-PRG 配合歯面研磨剤の口腔バイオフィームへの影響、第 137 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (広島市) 11.22-23, 2012.
 7. 伊波幸作、鈴木奈央、藤本暁江、米田雅裕、山田和彦、岩元知之、榎尾陽介、西原哲世、金子元気、春名一人、廣藤卓雄、ヒノキチオール配合口腔ケア用ジェルによる口腔清掃の口臭改善効果、第 137 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (広島市) 11.22-23, 2012.
 8. 榎尾陽介、鈴木奈央、米田雅裕、安 忠大、仲西宏介、藤本暁江、伊波幸作、瀬野恵衣、山田和彦、岩元知之、廣藤卓雄、S-PRG イオン溶出液と S-PRG 配合歯面研磨剤の口腔バイオフィームへの影響、第 39 回福岡歯科大学学会総会 (福岡市) 11.18, 2012.
 9. 米田雅裕、古賀千尋、鈴木奈央、内藤徹、廣藤卓雄、福岡歯科大学口腔医療センター口臭科の患者解析および口臭恐怖症の 1 症例、第 27 回日本歯科心身医学会総会・学術大会 (川崎市) 平成 24 年 9 月 1 日、2 日
 10. 藤本暁江、鈴木奈央、米田雅裕、伊波幸作、田邊一成、山田和彦、岩元知之、榎尾陽介、廣藤卓雄、真性口臭症における *Lactobacillus salivarius* WB21 株配合錠菓の有用性の検討、第 3 回日本口臭学会 (東京都) 平成 24 年 7 月 7, 8 日
 11. 鈴木奈央、中野善夫、米田雅裕、横瀬勝美、桑田文幸、廣藤卓雄、塩化亜鉛溶液の洗口による口腔内細菌叢の変動、第 3 回日本口臭学会 (東京都) 平成 24 年 7 月 7, 8 日
 12. 鈴木奈央、中野善夫、畑野優子、米田雅裕、横瀬勝美、桑田文幸、廣藤卓雄、塩化亜鉛曝露による口腔細菌構成の変化、第 136 回日本歯科保存学会春季大会 (宜野湾市) 平成 24 年 6 月 28, 29 日
 13. 藤本暁江、鈴木奈央、米田雅裕、田邊一成、山田和彦、岩元知之、榎尾陽介、伊波幸作、廣藤卓雄、*Lactobacillus salivarius* WB21 株配合錠菓の口臭抑制効果についての臨床研究～ランダム化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験～、第 136 回日本歯科保存学会春季大会 (宜野湾市) 平成 24 年 6 月 28, 29

- 日
14. 榊尾陽介、鈴木奈央、米田雅裕、内藤徹、山田和彦、岩元知之、藤本暁江、廣藤卓雄、βガラクトシダーゼの局在に関する検討および酵素活性と口臭との関連性について、第4回総合歯科協議会(新潟市)平成23年11月19日、20日
 15. 榊尾陽介、米田雅裕、鈴木奈央、山田和彦、岩元知之、藤本暁江、伊波幸作、廣藤卓雄、S-PRG 溶出液が歯周病原性細菌のプロテアーゼ活性および共凝集活性におよぼす影響、第135回日本歯科保存学会秋季学術大会(大阪市)平成23年10月20、21日
 16. 鈴木奈央、中野善夫、畑野優子、米田雅裕、横瀬勝美、桑田文幸、廣藤卓雄、塩化亜鉛溶液を用いた洗口による口腔常在フローラの変化、第135回日本歯科保存学会秋季学術大会(大阪市)平成23年10月20、21日
 17. 畑野優子、鈴木奈央、米田雅裕、山田和彦、岩元知之、榊尾陽介、藤本暁江、伊波幸作、廣藤卓雄、乳酸菌配合歯磨剤の口腔衛生改善効果についての臨床研究、第135回日本歯科保存学会秋季学術大会(大阪市)平成23年10月20、21日
 18. 竹下 徹、鈴木奈央、中野善夫、米田雅裕、廣藤卓雄、山下喜久、硫化水素およびメチルメルカプタン高産生口腔常在フローラの細菌構成、第53回歯科基礎医学会(岐阜市)平成23年9月30日-10月2日
 19. 榊尾陽介、米田雅裕、鈴木奈央、畑野優子、岩元知之、廣藤卓雄、S-PRG 溶出液が歯周病原性細菌のプロテアーゼ活性および共凝集活性におよぼす影響、第54回日本歯周病学会秋季学術大会(下関市)平成23年9月24日
 20. 鈴木奈央、田邊一成、竹下 徹、米田雅裕、岩元知之、大城末子、山下喜久、廣藤卓雄、*Lactobacillus salivarius* WB21 配合オイルの口腔内投与による口腔内環境の改善効果についての介入研究、第134回日本歯科保存学会春季大会(千葉市)平成23年6月9、10日
 21. 畑野優子、鈴木奈央、米田雅裕、山田和彦、岩元知之、榊尾陽介、藤本暁江、伊波幸作、廣藤卓雄、*Enterococcus faecium* WB2000株の mutans streptococci バイオフィルム形成に対する阻害作用についての *in vitro* 実験、第134回日本歯科保存学会春季大会(千葉市)平成23年6月9、10日

〔図書〕(計1件)

1. Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T. Relationship between oral malodor and oral microbiota. Oral Health

Care-Prosthodontics, Periodontology, Biology, Research and Systemic Conditions (ISBN 978-953-51-0040-9), In Tech, Feb, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 奈央 (TANIGUCHI NAO)

研究者番号：60372885

福岡歯科大学・歯学部・講師