

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593136

研究課題名(和文) T-RFLPを用いた歯周病細菌と咽頭部細菌の相互伝播の解明

研究課題名(英文) Assessment of transmission between oral and tonsillar microbiota by T-RFLP analysis based on oral malodor

研究代表者

福田 光男 (Fukuda, Mitsuo)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：40156790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯周治療後歯周病原細菌が駆除されても再感染を起こすケースがある。その再感染源として口蓋扁桃に注目した。口腔清掃が良好な患者に対し含嗽剤の介入をした。口蓋扁桃細菌を検索し、歯周病の徴候である口臭を指標として、再感染源となりうる細菌を検査した。9日間の含嗽は口臭を減少させた。口腔状態が良好な患者の咽頭部には歯周病原細菌が多く存在するわけではなく、それ以外のメチルメルカプタン産生に関わる細菌が関与している事が示唆された。この口蓋扁桃部から検出された *Veillonella*, *Prevotella* 属は口臭強度を上昇させていると考えられ、歯周病原細菌を誘導し、再感染源細菌となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We focused on tonsil as the source of the re-infection of periodontal pathogen based on oral malodor. Malodor is thought to be early sign of periodontal disease. Orally healthy patients were assigned to one of three groups. The volatile sulfur compounds in mouth air were assessed before and after gargling. For bacterial assessment, biofilm was got from the palatine tonsils. VSC-producing periodontal pathogens were detected in the samples and the bacterial profiles were analyzed by the T-RFLP. Clone libraries of two high malodor patients were sequenced for the T-RFs. Gargling reduced VSCs and the organoleptic score, but did not affect the periodontal pathogens. The T-RFLP analysis showed no significant change in the bacterial profile after gargling, but decrease in some of the T-RFs in the test. The candidate species assigned to these T-RFs contained VSC-producing bacteria such as *Veillonella* and *Prevotella* species.

研究分野：歯周病学

キーワード：細菌叢 歯周病 口臭

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病治癒後に定期的なメンテナンスをしていても、歯周病の進行・再発が防げない症例は少なくない。この原因として、口腔以外に生息する咽頭部(口蓋扁桃)バイオフィルムの可能性が考えられるが、これまで口腔と咽頭部の細菌の関連性については十分明らかとなっていない。口蓋扁桃の表層には陰窩があり複雑な形態をしているため、グラム陰性偏性嫌気性細菌が主体となる歯周病原細菌が棲息している可能性は高いと思われる。

(2) 一方、口臭は歯周病の徴候の一つであり、タンパク分解酵素を有する歯周病原菌により発生する口臭は、歯周病再発の指標となりうると考えられる。我々は鼻咽喉の感染が口臭と関連していることを報告し、咽頭部の細菌が舌を介して口腔内細菌叢の形成に関与している可能性があることを報告した。すなわち、咽頭部と口腔内にまたがり存在する舌が、咽頭部の細菌を口腔内に運搬し、歯周病原細菌の再感染をおこす役割を果たしている可能性がある。

2. 研究の目的

今回、一連のこれら口腔と咽頭部との感染経路を検証するために、歯周病の徴候のひとつである口臭強度と細菌叢に着目した。

歯科疾患や耳鼻咽喉疾患の感染防止策を見出すことを目的として、口腔と咽頭の細菌の関連性の検討、ならびにそれらに対する含嗽等の影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) 口蓋扁桃部のバイオフィルムの検索

オレリーのプラークコントロールレコードが20%以下の口腔清掃状態が良好で歯周疾患および扁桃腺炎、副鼻腔などの耳鼻咽喉科疾患を有していない、また3カ月以内に抗菌薬を服用していない30名の口臭患者に対し簡易型ガスクロマトグラフィ(オーラルクロマ)により口臭測定を行った。被験者を、メチルメルカプタン濃度26ppb以上のメチルメルカプタン高値群、26ppb未満のメチルメルカプタン低値群の2群に分類した。

その後、耳鼻科医により、口蓋扁桃表層からカルチャースワブを用いて、扁桃部のバイオフィルムの採取を行い、リアルタイムPCR法を用いた歯周病原細菌(*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*)の同定を、terminal restriction fragment length polymorphism解析法(T-RFLP)により、細菌叢のプロファイリングを行った。また、メチルメルカプタン濃度が特に高い2人の口蓋扁桃サンプルをクローニングし、口臭との関与が疑われる細菌の同定を行った。

(2) 塩化ベンゼトニウム溶液による含嗽の介入研究

口腔清掃状態が良好で歯周疾患に有していない29名の口臭患者を、Test群(塩化ベン

ゼトニウム, n=10)、Placebo群(滅菌蒸留水, n=10)、Control群(含嗽無し, n=9)の3群に分け、9日間含嗽による介入を行い、口臭、舌苔の評価を行った。Control群では、2日おきに来院させて、専門的口腔清掃(PMTC)を行った。さらに口蓋扁桃表層からカルチャースワブを用いて、咽頭部バイオフィルムの採取を行い、歯周病原細菌(リアルタイムPCR)、細菌叢プロファイリング(terminal restriction fragment length polymorphism解析)を行った。

4. 研究成果

(1) 歯周病原細菌(*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*)はメチルメルカプタン濃度の異なる2群において、検出されたが、検出率に有意な差は認められなかった。この結果から、口腔内状態が良好であれば咽頭部に歯周病原細菌が多く存在するわけではなく、それ以外の細菌がメチルメルカプタン産生に関連がある事が示唆された。

T-RFLP解析では、2群間で大きな差は無かった。しかし、違いが認められるいくつかの注目すべきT-RFsを発見した。

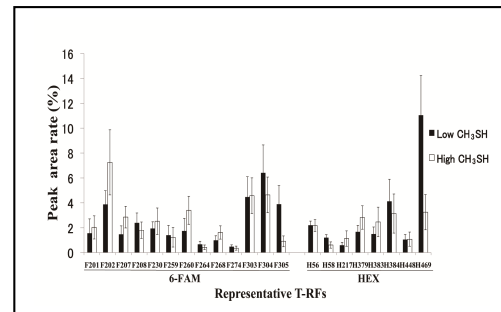


図1. 2群間での代表ピークの比較

注目したT-RFsの菌候補をクローニングした結果とGenBankのライブラリーと照合したところ、*Neisseria perflava*、*Chryseobacterium indologenes*、*Haemophilus parainfluenza*、*Prevotella*属であった。上記の菌がメチルメルカプタン産生に寄与する可能性が示唆された。

(2) 含嗽による介入において、Test群では、口臭の有意な軽減が認められたが、舌苔の状態は変化を示さなかった。このことは、殺菌成分含有の含嗽剤の使用により、咽頭部細菌叢に変化が起こったが、舌苔形成には影響がないと考えられる。

		CH ₃ SH濃度 (ppb)	官能試験	舌苔
Test (n=10)	baseline	91.3 ± 52.7	2.10 ± 0.56	2.00 ± 0.77
	9day	53.6 ± 40.2	1.67 ± 0.61	1.90 ± 0.83
	p-value ^b	0.013	0.027	0.317
Placebo (n=10)	baseline	63.1 ± 36.5	2.03 ± 0.66	1.6 ± 0.66
	9day	46.4 ± 32.7	1.70 ± 0.76	1.60 ± 0.80
	p-value ^b	0.237	0.115	1.000
Control (n=9)	baseline	44.4 ± 17.9	1.41 ± 0.54	1.67 ± 0.47
	9day	42.2 ± 31.4	1.07 ± 0.80	1.78 ± 0.42
	p-value ^b	0.484	0.067	0.317

表1. 口臭と舌苔に対しての含嗽剤の効果

舌苔は生理的口臭の76%に關与していることが報告されているが、今回、舌苔は關連がない事がわかった。これは、過去に報告されている含嗽の介入試験の結果と同様であった。

歯周病原細菌は含嗽前後で口蓋扁桃部のバイオフィルム細菌叢に有意な変化を示さなかった。しかし、T-RFLP解析による細菌叢のプロファイリングではいくつかの注目すべきT-RFsを発見した。

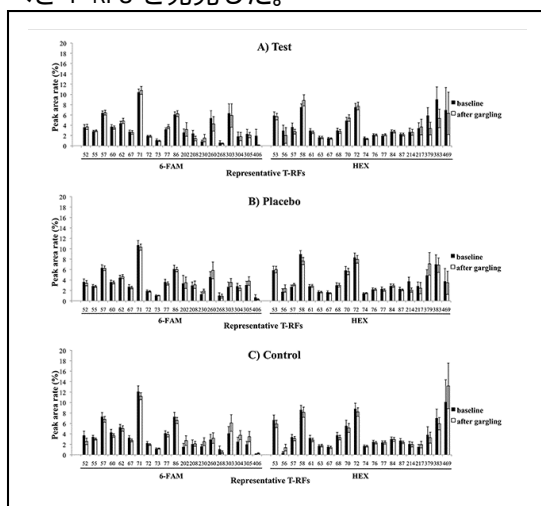


図2. 含嗽前後での代表ピークの比較

注目したT-RFsの菌候補をクローニングの結果とライブラリーを照合すると *Neisseria perflava*、*Moraxella catarrhalis*、*Veillonella atypica*、*Chryseobacterium indologenes*、*Prevotella*属、*Alloprevotella*属が合致した。*Neisseria*や*Prevotella*属は、*Porphyomonas gingivalis*、*Treponema denticola*、*Tannerella forsythia*などの代表的歯周病原細菌と同時に検出されることが多い菌である。

(3) 咽頭に付着しているバイオフィルム自体が口臭の発生源となること、またバイオフィルムに対して含嗽剤を使用する事で、細菌叢を若干変化させ、口臭を軽減させる事がわかった。

今回、口臭に差がある場合でも、口蓋扁桃部から検出された歯周病原細菌群に大きな差異が認められなかったが、*Neisseria*、*Prevotella*属、などメチルメルカプタンを産生する菌群では差が認められた。このことは、歯周病菌定着の前提として、これらの細菌が関わり、まず口臭レベルを押し上げていることが示唆された。

また、含嗽による介入で、咽頭の歯周病原細菌が有意な変化を示さなかったことから、口腔内から歯周病細菌を排除しても咽頭部には、歯周病原細菌が存在し続ける可能性があり、歯周病の再感染の感染源となりうることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計6件)

岩村 侑樹、林 潤一郎、佐藤 孝至、佐藤 聡太、村上 多恵子、藤村 岳樹、佐々木 康之、高橋 枝里、嶋崎 義浩、三谷 章雄、福田 光男：口蓋扁桃細菌叢と口臭との関連-含嗽剤を用いた介入研究、第6回日本口臭学会学術大会、2015/7/4、新潟

高橋 枝里、村上 多恵子、橋本 洋子、藤村 岳樹、岩村 侑樹、佐々木 康行、嶋崎 義浩、金森 孝雄、林 潤一郎、三谷 章雄、福田 光男：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、第6回日本口臭学会学術大会、2015/7/4、新潟

村上 多恵子、福田 光男、橋本 洋子、金森 孝雄、三谷 章雄、嶋崎 義浩：唾液中のタンパクおよび α -galactosidase 活性の日内変動と生理的口臭、第64回日本口腔衛生学会、2015/5/28、つくば

福田 光男：シンポジウム：口臭と口臭症への取り組み-歯科の立場から-、日本口臭学会第5回学術大会、2014/7/6、大阪

岩村 侑樹、福田 光男、林 潤一郎、佐藤 聡太、藤村 岳樹、高橋 枝里、佐々木 康行、村上 多恵子、佐藤 孝至、嶋崎 義浩、三谷 章雄：唾液および咽頭部細菌叢のT-RFLP法による解析データと口臭との関連、日本口臭学会第5回学術大会、2014/7/6、大阪

岩村 侑樹、福田 光男、三谷 章雄、林 潤一郎、佐藤 聡太、高橋 伸行、藤村 岳樹、岡田 康佑、村上 多恵子、佐藤 孝至、嶋崎 義浩、野口 俊英：T-RFLP法による咽頭領域の細菌叢解析と口臭との関連、第57回春季日本歯周病学会学術大会、2014/5/23、岐阜

[図書](計1件)

角田正健、喜多成价、久保伸夫、角田博之、福田光男、本田俊一、宮地英雄：口臭への対応と口臭症治療の指針2014：日本口臭学会編ガイドライン委員会。竹田印刷、2015.5.名古屋。

6. 研究組織

(1)研究代表者

福田 光男 (Fukuda Mitsuo)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：40156790

(2)研究分担者

野口 俊英(Noguchi Toshihide)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：50014262

三谷 章雄(Mitani Akio)

愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：50329611

(3)連携研究者

佐藤 孝至(Sato Takashi)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号：00387573

(4) 研究協力者

林 潤一郎(Hayashi Jun-ichiro)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号：30350937

佐藤 聡太(Sato Sota)
愛知学院大学・歯学部・非常勤助教
研究者番号：40647054