研究者：松井　美樹（所属：岩手医科大学口腔保健育成学講座口腔保健学分野）

研究題目：糖質摂取が口腔内細菌由来の口臭に及ぼす影響

目　的：

口臭は歯周病患者のみならず，歯周病健全者にも認められる。これを一般的に生理的口臭と呼び，舌苔の付着がその主要な原因の１つと考えられている。生理的口臭の主成分は歯周病患者における口臭と同様に揮発性硫黄化合物であり，それを産生するのは歯周病原性細菌のような含硫アミノ酸を分解性微生物である。舌苔は歯垢と同様に細菌の凝集塊であり，歯周病健全者においてもそこに歯周病原性細菌が存在していることがこれまでに報告されている[1)]。それ故，舌苔中の歯周病原性細菌量の減少は生理的口臭の抑制に寄与すると考えられる。本研究では，歯周病有病者以外にも常在しかつ歯周疾患と関連が高い *Fusobacterium* に着目し，糖質摂取によるその細菌への影響を検討することを目的とした。それに先立ち，舌苔，歯垢サンプル中の総菌量，*Fusobacteriumnucleatum* 量を測定する方法の確立を目指し，歯周病健全者を対象として，舌苔及び歯垢中の同微生物の変動とそれによる口臭への影響を定量的に評価し，関連を検討した。

対象および方法：

全身疾患，服薬及び 4 mm 以上の歯周ポケット有さない歯学部学生 21 名（男性 17 名，女性 4 名，平均年齢 23.5 ± 3.2 歳）を対象とし，以下の工程でデータ及び試料採取を行った。

1. 3 時間以上の飲食停止後の被検者の口中気体の揮発性硫黄化合物（VSCs）濃度を採取し，ガスクロマトグラフィー（Shimazu GC-8）による定量分析に供した。

2. 舌苔付着状況を Winkel Tongue Coating Index（WTCI）[2)] の評価基準により，視診にて判定した。

3. 被験者の舌苔と歯垢を採取した。舌苔は滅菌したマイクロスパーテルで舌背を 3 ストローク擦過して採取した。また，歯垢は下顎両側第一大臼歯舌側歯肉縁から歯科用探針を用いて採取した。両試料は直ちに 5 ml Phosphate Buffered Saline（PBS，pH 7.0）に浸漬し，氷上保存し，その後－20℃で使用時まで凍結保存した。

4. 我々が提案した機器を用いた方法[3)] により，被験者に対して標準化した舌清掃を行った。すなわち，ソニックフレックスクリーンブラシ（KaVo 社）を 50～80 gf の刷掃圧で用いた。この方法により，WTCI が 0 と判定されるまで舌清掃を行った。

5. 清掃 1, 2, 3 日後の舌苔付着状況を WTCI で判定した。3 日目には，口中気体の VSCs 濃度測定と舌苔，歯垢試料の採取を同様に行った。

採取した舌苔，歯垢試料から，Wizard®Genomic DNA Purification Kit の製品マニュアルに準じた方法でゲノム DNA を精製した。その後，16S rRNA の保存領域をターゲットとしたプライマー［forward（TGG AGC ATG TGG TTT AAT TCG A, reverse（TGC GGG ACT TAA CCC AAC A)］と *Fusobacteriumnucleatum* 特異的プライマー［forward（GCG GAA

CTA CAA GTG TAG AGG TG），reverse（GTT CGA CCC CCA ACA CCT ACT A）］を用い，SYBR Green インターカレーター法による real-time PCR system（PCR Thermal Cycler Dice®，TaKaRa）で，総菌量，*F. nucleatum* 量をそれぞれ以下の要領で定量した。すなわち，1ウェルあたりの反応混液を，SYBR®Premix Ex Taq™ Ⅱ（Perfect Real Time）10*μl*，10 μM プライマー各1 *μl*，テンプレート DNA サンプル 1 *μl*，および滅菌蒸留水 7 *μl* を含むよう調整した。95℃ 30 秒の初期熱変性の後，95℃ 5 秒，60℃ 1 分を 40 cycles で 2steps の増幅，さらに 95℃ 15 秒，60℃ 30 秒，95℃ 15 秒を 1 cycle の分離条件により，PCR を行った。サンプル中の細菌量は，増幅曲線および検量線をもとに決定したゲノム重量として表した。検量線作成のための細菌株には，総菌数には *Escherichia coli* ATCC 53868 を，*F. nucleatum* には *F.nucleatum* ATCC25586 を用いた。

結果および考察：

清掃 1 日後では，WTCI は清掃前に比べて有意に低い値を呈し（$p < 0.001$），2 日目には上昇したものの，清掃前に比べ低い値を維持した（$p = 0.077$）。しかし 3 日目には WTCI 平均値は清掃前近くまで上昇した（図 1）。これらから，舌苔をほぼ完全に除去しても約 3 日後には除去前と同程度の付着状態が回復することが示された。そこで，試料からゲノム DNA を抽出できなかった 3 名を除く 18 名について，舌清掃前と清掃 3 日後の総細菌量，*F. nucleatum* 量，VSCs の比較，ならびに各時点での舌苔と歯垢中細菌量の関連について検討した。その結果，舌苔，歯垢とも総菌量，*F. nucleatum* 量に有意差は認められなかった。しかし，総菌量，*F. nucleatum* 量とも，舌苔よりも歯垢で清掃 3 日後に少ない傾向にあり，歯垢付着に先立って舌苔の再付着が生じることが示唆された（表 1）。口中気体の VSCs 濃度の平均値は清掃前 193 ± 300ppb に対して清掃後は 269 ± 702ppb であり，差はなかった（Wilcoxon 検定，$p = 0.593$）。さらに，両時点における舌苔と歯垢の細菌量，VSCs 濃度および WTCI の関連を Spearman の順位相関分析で検討した。両時点とも有意な関連が見られたのは歯垢中総菌量と舌苔中総菌量および舌苔中総菌量と舌苔中 *F. nucleatum* 量の関係であった。一方，舌苔中と歯垢中の *F. nucleatum* 量の関連は，清掃前には有意だったが，清掃 3 日後では認められなかった。また，VSCs 濃度は清掃前に，舌苔中ならびに歯垢中の *F. nucleatum* 量に対して有意ではないが強い相関の見られた（対舌苔中 *F. nucleatum* 量：$\rho = 0.456$，$p = 0.057$；対歯垢中 *F. nucleatum* 量：$\rho = 0.427$，$p = 0.078$）が，清掃後には関連が認めらず，WTCI とのみ関連した（表 2）。

以上の結果から，舌苔と歯垢の形成速度には差があり，歯垢形成初期には先に成熟した舌苔から *F. nucleatum* などの常在菌が歯垢に供給されているのではないかと考えられた。また，舌苔，歯垢とも成熟程度によって，口臭へ及ぼす影響が異なる可能性も示唆された。

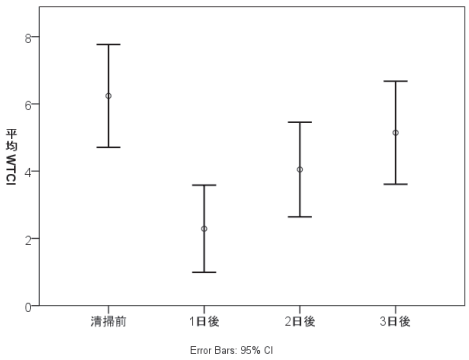


図 1　舌苔除去後の WTCI スコアの変化

表 1　清掃前後の舌苔，歯垢試料中細菌量（ゲノム重量）

細菌	試　料	採取時	平均値±標準偏差（pg）	p 値*
総菌量	舌　苔	清掃前	2,419 ± 4,881	0.713
（16S rRNA Universal）		清掃後	1,874 ± 3,882	
	歯　垢	清掃前	2,566 ± 5,855	0.139
		清掃後	412 ± 670	
F. nucleatum	舌　苔	清掃前	44.0 ± 132	0.532
		清掃後	69.3 ± 159	
	歯　垢	清掃前	91.8 ± 202	0.260
		清掃後	32.7 ± 57.7	

*対応のある t 検定

表 2　清掃前後での細菌量，WTCI および VSCs の関連

		順位相関係数	p 値
清掃前	舌苔中 F. n. 量－歯垢中 F. n. 量	0.540	0.021
	歯垢中総菌量－舌苔中総菌量	0.620	0.006
	舌苔中総菌量－舌苔中 F. n. 量	0.688	0.002
清掃 3 日後	歯垢中総菌量－舌苔中総菌量	0.870	＜0.001
	舌苔中総菌量－舌苔中 F. n. 量	0.523	0.026
	WTCI-VSCs 濃度	0.471	0.049

表は有意な関連のみを示した。F. n.：*F. nucleatum*

参　考：

1）高橋雅洋，岸　光男：舌苔中の歯科疾患関連細菌と口腔内状況との関連性，口腔衛生会誌，56：137-147, 2006.

2）Winkel EG, Roldán S, Van Winkelhoff AJ, Herrera D, Sanz M. Clinical effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc-lactate on oral halitosis. A dual-center, double-blind placebo-controlled study. J ClinPeriodontol 30：300-306, 2003.

3）小野寺奈津子，國安那月，浪岡多津子，岸光男，米満正美，関根真理子：機器を用いた専門的舌清掃の有効性評価，日本歯科衛生学会雑誌，4：41-49, 2009.

成果発表：

第 6 回日本歯科衛生学会・学術大会

第 1 回東北口腔衛生学会総会・学術大会

第 61 回日本口腔衛生学会総会・学術大会（発表予定）