

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

岩村 侑樹

論文題目

咽頭部細菌叢の Terminal Restriction Fragment  
Length Polymorphism 法による解析データと口臭との  
関連

## I. 緒言

口臭は、生理的口臭と病的口臭の二つに大別される。生理的口臭は、器質的疾患が認められないにも関わらず発生するものを指し、舌清掃を併用した口腔清掃を徹底することにより軽減する。一方、病的口臭は、原疾患を治療することにより軽減する。病的口臭の原因は主に歯科疾患と耳鼻咽喉部疾患で、その他の原因の頻度は低いとされている。

臨床では、歯周病に罹患しておらず、良好な口腔清掃状態が確立した後も期待される程生理的口臭が軽減しない患者に遭遇することがある。その原因の一つとして、代表的な口臭ガスであるメチルメルカプタン ( $\text{CH}_3\text{SH}$ )、硫化水素 ( $\text{H}_2\text{S}$ )、ジメチルサルファイド ( $\text{CH}_3\text{SCH}_3$ ) などの揮発性硫黄化合物 (Volatile Sulfer Compounds、VSCs) を発生させる細菌が口腔内以外の部位に存在する可能性が考えられる。

咽頭領域は、口腔と解剖学的に隣接しており、咽頭部細菌叢の構成は口腔内細菌叢に相互的な影響を与えていると考えられ、VSC 産生に関与する菌が咽頭部に存在する可能性がある。

そこで、我々は生理的口臭の原因として咽頭部細菌叢に注目し、Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 法を用いて細菌叢プロファイリングを行い、口臭強度と細菌叢に関連があるかを調査することとした(研究 1)。また、咽頭部への塩化ベンゼトニウム (BZC) 含嗽が、咽頭部細菌叢を変化させられるかについて臨床介入研究を行った(研究 2)。

## II. 対象および方法

### (研究 1)

愛知学院大学口臭治療科に来科された患者のうち治療に必要な歯周疾患、耳鼻咽喉部疾患を有していない60人の口臭患者から口蓋扁桃バイオフィルムのサンプリングを行った。官能試験との相関が高い  $\text{CH}_3\text{SH}$  濃度で Low 群( $\text{CH}_3\text{SH}$  濃度 26 ppb 未満  $n = 27$ )と、High 群( $\text{CH}_3\text{SH}$  濃度 26ppb 以上  $n = 33$ ) の2群に分け、口蓋扁桃部の *Porphyromonas gingivalis*、*Treponema denticola*、*Tannerella forsythia*、*Prevotella intermedia* の検出率、T-RFLP 解析による口蓋扁桃細菌叢プロファイリングを2群間で比較した。また、クローンライブラリーを作製し、候補細菌の推定を行った。

### (研究 2)

愛知学院大学口臭治療科に来科された患者のうち治療に必要な歯周疾患、耳鼻咽喉部疾患を有していない29人の口臭患者を 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研究を行い、口臭強度( $\text{CH}_3\text{SH}$ 、 $\text{H}_2\text{S}$ 、 $\text{CH}_3\text{SCH}_3$ 、官能検査値; ORS)、舌苔付着度(TCS)、細菌の評価を行った。細菌の評価は唾液と口蓋扁桃サンプルを用い、歯周病原細菌の検索と T-RFLP 解析による細菌叢プロファイリングを行った。

なお研究 1、2 は倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号 227、371)

### Ⅲ. 結果

#### (研究 1)

口蓋扁桃部の歯周病原細菌の検出率は 4 菌種共に 2 群間で有意な差は認められなかった。T-RFLP 解析では、Low 群と比較して High 群で有意に高い Peak area rate を認める T-RF は HEX で蛍光標識された 378、447 bp の T-RF、High 群と比較して Low 群で有意に高い Peak area rate を認める T-RF は HEX で蛍光標識された 383 bp の T-RF であった。

これらの T-RF を作製したクローンライブラリーと照合したところ、High 群で有意に高い Peak area rate を認める T-RF の候補菌は、*Neisseria perflava*、*Prevotella pallens*、*Prevotella histicola*、*Alloprevotella tanneriae*、*Alloprevotella rava*、*Lachnoanaerobaculum orale*、*[Clostridium] algidixylanolyticum*、*Fusobacterium nucleatum* であった。また、Low 群で有意に高い Peak area rate を認める T-RF の候補菌は *Moraxella catarrhalis*、*Veillonella atypica*、*Chryseobacterium indologenes* であった。

#### (研究 2)

Test 群において、 $\text{CH}_3\text{SH}$ 、 $\text{H}_2\text{S}$  濃度と ORS は含嗽後に有意な減少を認めた。Placebo、Control 群は口臭強度の有意な変化が認められなかった。また、TCS は 3 群共に含嗽前後で有意な変化は認められなかった。唾液、口蓋扁桃部の歯周病原細菌の検出率は 4 菌種共に 2 群間で有意な差は認め

られなかった。口蓋扁桃部、唾液サンプルでの T-RFLP 解析では、含嗽前後で有意に変化する T-RF は 3 群ともに認められなかった。しかし、口蓋扁桃部サンプルの HEX で蛍光標識された 379、383 bp は、TEST 群で含嗽後減少傾向を示した。そこで研究 1 で使用した口蓋扁桃クローンライブラリーにて、候補菌の検索を行ったところ、*Prevotella*、*Alloprevotella* 属、*V. atypica*、*N. perflava*、*M. catarrhalis*、*C. indologenes* が該当した。

#### IV. 考察

##### (研究 1)

歯周疾患、耳鼻咽喉部疾患を有さない口臭患者では、4 菌種の歯周病原細菌の検出率の結果から、歯周病原細菌は被験者の口臭に大きな影響を与えておらず、歯周病原細菌以外の菌種が口臭と関連する可能性が考えられた。

High 群で有意に高い Peak area rate を認める T-RF の候補菌のうち、*F. nucleatum*、*Prevotella* 属はグラム陰性偏性嫌気性桿菌で、 $\text{CH}_3\text{SH}$  産生の一因となることは既に報告がある。しかし、*C. algidixylanolyticum*、*Clostridium* 属、*Alloprevotella* 属は、口臭との関連はまだ報告されていない。*N. perflava* はグラム陰性好気性双球菌で、咽頭に存在する非病原性の常在菌で、 $\beta$ -ラクタム耐性である。*L. orale* は口腔内の唾液中に存在するグラム陽性菌で、生理的口臭との関与があるとされる  $\beta$ -galactosidase を有し

ており、 $\text{H}_2\text{S}$  を産生する。

また、Low 群で有意に高い Peak area rate を認める T-RF の候補菌のうち、*M. catarrhalis*、*C. indologenes* はグラム陰性好気性球菌で咽頭や気道で検出されるが、VSC 産生を行うという報告はない。*Veillonella* 属は、代表的な VSC 産生菌で、 $\text{CH}_3\text{SH} / \text{H}_2\text{S}$  比が高値であると報告されている。

このように、口臭との関連が疑われる口蓋扁桃部の細菌がいくつか推定されるが、注目した T-RF 内の候補菌がどの程度存在するかについての詳細は不明であった。今後、候補菌については、更にリアルタイム PCR などを用いた定量を行う必要があると思われる。

## (研究 2)

クロルヘキシジン(CHX)含有の洗口剤は、口臭減少に役立つ事はよく知られているが、日本での CHX 含有の洗口剤の使用濃度が、報告されている口臭治療の有効濃度と比較して極端に低いことを考えると、口臭抑制に有効であるかは疑問である。そのため、本研究では抗菌作用を有する BZC を使用した。

舌苔細菌叢に影響を与える因子となる舌苔除去については、唾液中の細菌叢に影響を与え、さらに咽頭部細菌叢にも影響を与える恐れがあるため、舌苔除去を研究期間中に実施しないよう指示した。

舌苔細菌叢に対する含嗽剤の影響については、洗口剤を 2 週間使用後、

舌苔中のいくつかの細菌種は減少を認めるが、細菌数と VSC レベル間に相関関係がないという報告がある一方、洗口剤を 2 週間使用後、口臭の減少を認めたが、TCS には影響を及ぼさなかったという報告もあり、見解は分かれる。我々の研究結果は後者の結果と類似しているが、舌苔細菌叢に対する含嗽剤の影響に関しては、不明な部分も多く、さらなる研究が望まれる。

今回、含嗽剤の一回量を少なくし、口腔内への影響に対して配慮したが、口腔内細菌叢の変化により、口臭強度が変化する事も十分考えるため、研究 2 では咽頭細菌叢を調査する共に、口腔内細菌叢の代表として唾液中の細菌叢も同時に検討した。

4 菌種の歯周病原細菌が、含嗽前後で 3 群共に検出率が有意に変化しなかったのは、歯周炎に罹患していない被験者で実施し、歯周病原細菌数が少なかったためと推測される。

T-RFLP 解析の結果、口蓋扁桃部サンプルでは TEST 群において、減少傾向を示した T-RF が存在し、それらの候補菌のうち、*Prevotella*、*Veillonella* 属などの口臭産生に関与する菌の減少が口臭軽減に寄与したものと推測される。ただ、研究 1、2 の T-RFLP 解析の結果が少し異なってしまったことについては、さらに口蓋扁桃部のサンプル数を増やして再検討の必要があると思われる。また、スプレーなどを用いた咽頭部への局所投与に関しても今後検討していく必要がある。

## V. まとめ

本研究において、治療の必要な歯周疾患、耳鼻咽喉部疾患を有しておらず、口腔清掃状態が良好な口臭患者を  $\text{CH}_3\text{SH}$  濃度で2群に分類し、口蓋扁桃細菌叢を比較すると、異なる細菌叢を構成する可能性があることがわかった。また、BZC含有含嗽剤での含嗽前後の口臭強度、T-RFLP解析、クローンライブラリー解析から、口臭に関連する可能性のある候補となる菌の存在が示唆された。