

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 719 号	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

口臭として認知される揮発性物質は硫黄化合物、芳香族化合物、短鎖脂肪酸、脂肪族化合物、アルデヒドそしてケトン類などがある。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ある。歯周病は、病的口臭の代表疾患であり、Quirynenらは、76%は口腔内に原因があり、舌苔、歯肉炎/歯周炎、またはその両方が原因であるのは、それぞれ43%、11%、18%であると報告している。耳鼻咽喉科領域は、病的口臭のもう一つの代表領域であり、耳鼻咽喉科領域、扁桃腺が原因の口臭は3~10%と報告されている。

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(CH<sub>3</sub>SH)、硫化水素(H<sub>2</sub>S)、ジメチルサルファイド(CH<sub>3</sub>SCH<sub>3</sub>)などの揮発性硫黄化合物(Volatile Sulfur 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、VSCs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)

#### 1. 被験者

被験者は、2012年度から2014年度にかけて、口臭治療のため愛知学院大学歯学部附属病院口臭治療科に来院し、本研究の主旨を理解し、協力の得られた病的口臭の原因となりうる疾患を有さない60名(男性14名、女性46名、平均年齢58.0歳)とした。

官能試験との相関が高いCH<sub>3</sub>SH濃度でLow group (CH<sub>3</sub>SH濃度26ppb未満n=27)とHigh group (CH<sub>3</sub>SH濃度26ppb以上n=33)の2群に分類した。なお、本研究は愛知学院大学歯学部倫理委員会の承認のもとに行った。(承認番号227)

#### 2. 臨床検査

被験者の口臭強度の測定を、オーラルクロマ®(アビメディカル株式会社、神奈川)を用いて、午後3時から4時の時間帯に測定を行った。また、患者には飲食後に口腔清掃を行い、その後2時間以上飲食を控えた状態で来院してもらい、測定直前に1分間閉口させてから0.5ccの呼気を採取し、代表的な口臭ガスであるCH<sub>3</sub>SH、H<sub>2</sub>S、CH<sub>3</sub>SCH<sub>3</sub>濃度の測定を行った。

#### 3. 口蓋扁桃細菌叢の検索

愛知学院大学附属病院耳鼻咽喉科にて、カルチャースワブ®(日本BD、東京)を用いて口蓋扁桃表層よりぬぐい液を採取したものを、リアルタイムPCR、T-RFLP解析用及びクローンライブラリー作製の口蓋扁桃サンプルとした。上記サンプルの総菌中、*Porphyromonas gingivalis*、*Treponema denticola*、*Tannerella forsythia*、*Prevotella intermedia*の代表的な4菌種の歯周病原細菌について、リアルタイムPCR(Taqman法)を用いて咽頭部の検出率を検討した。検出の有無は、各サンプルの総菌数に対して0.0001%以上の細菌を検出とした。口蓋扁桃細菌叢プロファイリングとして、今回T-RFLP解析を行った。T-RFLP解析には保存性が高く、細菌種の同定によく用いられる全長1541bpの16SrRNA遺伝子の一部領域の増幅のため、6-

## (学位論文の内容を要約したもの)

No. 2

愛知学院大学

carboxyfluorescein (6-FAM) 標識フォワードプライマー8F、hexachlorofluorescein (HEX) 標識リバースプライマー806R、KOD DNA polymerase (東洋紡株式会社、大阪) を使用した。約 800 塩基対の平滑末端 PCR 産物を FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス株式会社、東京) で精製後、PCR 精製物を HaeIII にて 37°C、1 時間の制限酵素処理を行った。その後、ABI 3130 genetic analyzer および GeneMapper (Applied Biosystems、USA) にてフラグメントを解析した。各 T-RF の定量的評価は得られた蛍光強度波形の各ピークの面積を合計した全面積に対する割合 (Peak area rate) を用いて行った。6-FAM、HEX で蛍光標識された T-RF のうち Peak area rate の上位 20 個ずつを選出し、比較検討を行った。口蓋扁桃細菌叢の 16SrRNA クローンライブラリー作製のため、CH<sub>3</sub>SH 濃度が高い 2 人の被験者から得た口蓋扁桃サンプルの 16SrRNA 遺伝子の一部を蛍光標識されていない 8F 及び 806R プライマーを用いて増幅した。PCR 産物のクローニングに TOPO TA クローニング (Invitrogen、USA) を用い、形質転換には DH5 $\alpha$  大腸菌を使用した。X-Gal とアンピシリンを塗布した LB 寒天培地に播種し、37°C、12 時間培養した。被験者 1 人当たり 100 個のコロニーを無作為に選別した。インサートされている事を確認するため、Emerald Amp<sup>®</sup> PCR Master Mix (TaKaRa、日本) と M13 プライマーを用いたダイレクトコロニー PCR と 2%アガロースゲルでの電気泳動を行った。正しいサイズ (798 bp) の挿入を確認したコロニーを、2 $\times$ YT 培地で 37°C、12 時間培養し、プラスミドを FastGene プラスミドミニキット (日本ジェネティクス、東京) を用いて抽出した。インサートされた DNA は BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems、USA) と M13 プライマー、ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems、USA) を用いてシーケンスした。BLAST プログラムを使用して、得られたシーケンスは、GenBank (<http://www.ncbi.nlm.gov>) のシーケンスデータと比較した。GenBank のデータベース上で 98% の一致率で、最も一致した細菌種を同定と判定した。同定した細菌の T-RF の断片長を塩基配列から推測し、T-RFLP 解析で注目した T-RF に近似している細菌種を検索した。

#### 4. 統計処理

分析には、統計ソフト SPSS (SPSS ver.18; SPSS Japan、東京) を用いた。正規性の検討には、Kolmogorov-Smirnov 検定を用いた。その結果、今回の各臨床検査値と T-RFLP データはすべて非正規分布であったため、Mann-Whitney の U 検定を用い、有意差を求めた。臨床パラメータの性別と歯周病細菌の検出率はピアソンの  $\chi^2$  検定を用い、有意差を求めた。P<0.05 で統計学的に有意であるとした。尚、各臨床検査値は平均値と標準偏差、T-RFLP 解析の Peak area rate は平均値と標準誤差で表現した。

### (研究 2)

#### 1. 被験者

被験者は、2013 年度から 2014 年度にかけて、口臭治療のため愛知学院大学歯学部附属病院口臭治療科に来科された 228 人のうち、口腔清掃状態良好で生理的口臭を有する 29 名 (男性 7 名、女性 22 名、平均年齢 60.9 歳) を被験者とした。なお、本研究は愛知学院大学歯学部倫理委員会の承認のもとに行った。(承認番号 371)

#### 2. 研究デザイン

29 人の被験者はコンピュータを用いた単純ランダム化により 3 群に分類した。Test 群 (N=10) は BZC 含有洗口剤 (ネオステリングリーン<sup>®</sup>) を 50 倍希釈した溶液 (0.004%BZC 含有)、Placebo 群 (N=10) は滅菌蒸留水に人工着色料を添加したものをを用いた。9 日間 1 日 4 回 (毎食後および就寝前)、1 回あたり 10ml、1 分間の含嗽を指示した。Control 群には含嗽を指示しなかった。9 日間の研究期間中、すべての被験者に対し、3 日ごとに専門的機械的歯面清掃を実施した。口臭検査、舌苔スコア (tongue-coating score、TCS) と口蓋扁桃部、唾液からのサンプリングは、ベースライン時と 9 日後に行い、比較検討を行った。唾液からのサンプリングのため、口腔細菌検査用採取セット<sup>®</sup> (株式会社ジーシー、東京) を用いて、専用のガムを 5 分間噛ませて刺激唾液を採取した。口蓋扁桃細菌叢の評価は 4 菌種の歯周病原細菌の検出率と T-

## (学位論文の内容を要約したもの)

No. 3

昭和学院大学

RFLP 解析にて行った。また、含嗽剤が唾液中の細菌叢に大きな影響を与えていないことを確認するため、4 菌種の歯周病原細菌の検出率と T-RFLP 解析を行った。

### 3. 臨床検査

歯周ポケット深さ、アタッチメントレベル、プロービング時の歯肉出血部位、歯周ポケット深さ 4mm 以上の部位率、O' Leary の Plaque Control Record を用い、歯周組織の状態および口腔清掃状態を評価した。口臭検査はオーラルクロマ<sup>®</sup>にて代表的な口臭ガスである CH<sub>3</sub>SH、H<sub>2</sub>S、CH<sub>3</sub>SCH<sub>3</sub> 濃度の測定と、0-5 の官能スコア (organoleptic score、ORS) での評価を行った。TCS は小島の分類に基づいた 0-4 のスコアで評価を行った。また、ベースライン時での耳鼻咽喉部疾患がない事を、耳鼻咽喉科での診察にて確認した。

### 4. 統計処理

分析には、統計ソフト SPSS (SPSS ver. 18; SPSS Japan、東京) を用いた。正規性の検討には、Kolmogorov-Smirnov 検定を用いた。その結果、今回の各臨床検査値と T-RFLP データはすべて非正規分布であった。ベースライン時の CH<sub>3</sub>SH、H<sub>2</sub>S、CH<sub>3</sub>SCH<sub>3</sub> 濃度、ORS と TCS の相関は、Spearman の順位相関係数を用いた。ベースライン時の 3 群間の臨床パラメータの比較には Kruskal-Wallis 検定を用いた。臨床パラメータの性別と歯周病細菌の検出率はピアソンの  $\chi^2$  検定を用いた。ベースライン時と 9 日後の口臭検査、TCS、T-RFLP 解析の Peak area rate の比較検討には Wilcoxon の符号順位検定を用いた。P<0.05 で統計学的に有意であるとした。尚、各臨床検査値は平均値と標準偏差、T-RFLP 解析の Peak area rate は平均値と標準誤差で表現した。

## 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、447bp 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 383bp 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、CH<sub>3</sub>SH、H<sub>2</sub>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、383bp 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 )

## (学位論文の内容を要約したもの)

No. 4

昭和学院大学

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)

クロールヘキシジン (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* 属、*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、治療に必要な歯周疾患、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。しかし、口蓋扁桃細菌叢と口臭との関連はまだ不明な点も多く、今後もより詳細な研究が必要であることが考えられる。