

歯周病菌が産生する揮発性化合物のプロファイリング

生物学専攻 生物学コース

生物資源工学領域 福崎研究室 森 あすか

1. 研究背景

口臭は口腔から発せられる不快なおいを指す言葉であり、全世界の人口の15%から60%が経験していると言われる一般的な問題である。口臭は、主に歯周病菌が産生する揮発性化合物によって形成される。硫化水素、メタンチオール、ジメチルサルファイドの3つの揮発性硫黄化合物（VSC）は、低いにおいの閾値を有することから、主要な口臭原因成分として知られている。口臭診断では検査者が口臭の強度を判断する官能評価と、VSCの濃度を測定するVSCモニターが併用されることが多い。しかし、これら2つの測定結果は弱い相関しか示さないことから、正確な口臭診断のためには、マーカーとなる新たなにおい成分の探索が必要とされている。

ガスクロマトグラフィー質量分析法（GC/MS）は、VSCを含む口臭の原因となる揮発性化合物を網羅的に分析する有用な手法である。一般的に口臭の原因となる揮発性化合物は、呼気中で低濃度に存在するため、GC/MS分析の前に濃縮工程が必要になる。モノリス型多孔質シリカゲル吸着剤であるMonoTrapは、大きな表面積を有することから、揮発性化合物の濃縮に有用である。また、におい嗅ぎGC/MS分析は、質量分析法による化合物の同定と、ヒトの嗅覚によるにおいの評価を組み合わせた分析技術であり、臭気閾値が低い成分の検出に有効である（図1）。



そこで本研究では、MonoTrapによる揮発性化合物の濃縮捕集と、におい嗅ぎGC/MS分析を組み合わせることで、歯周病菌が産生する揮発性化合物のプロファイリングを行い、新たなにおい成分を探索することを目的とした。

2. 実験方法

本研究では、2種の歯周病菌 *Fusobacterium nucleatum* および *Porphyromonas gingivalis* を対象とし、培養は37°C、嫌気性条件下で行った。まず、血液寒天培地で培養してコロニーを採取し、液体培地に移した。12時間培養後、吸光度（OD_{600 nm}）が0.1、液量が15 mLとなるように新しい培地に移した。24時間培養後、遠心分離により菌体を取り除き、培養上清を回収した。回収した培養上清の気相部分にMonoTrapを設置し、40°Cで2時間保温して揮発性化合物を捕集した後、におい嗅ぎGC/MS分析を行った。

3. 結果と考察

2種の歯周病菌 *F. nucleatum* と *P. gingivalis* の培養上清の揮発性化合物を MonoTrap で捕集し、におい嗅ぎ GC/MS を用いて分析した。得られたトータルイオンカレントクロマトグラム (TICC) を図 2 に示した。TICC から、歯周病菌培養上清と培地との明確な差が観察された。結果として、歯周病菌は VSC に加えて、アルコールや芳香族化合物など様々なクラスに属する揮発性化合物を産生することが明らかになった。

さらに、*F. nucleatum* の培養上清からは、9種のVSCを含む17成分の臭気が、*P. gingivalis* の培養上清からは、6種のVSCを含む20成分の臭気が検出された。*F. nucleatum* および *P. gingivalis* の培養上清ではインドールが有意に増加した。インドールの臭気閾値は 0.0003 ppm と低

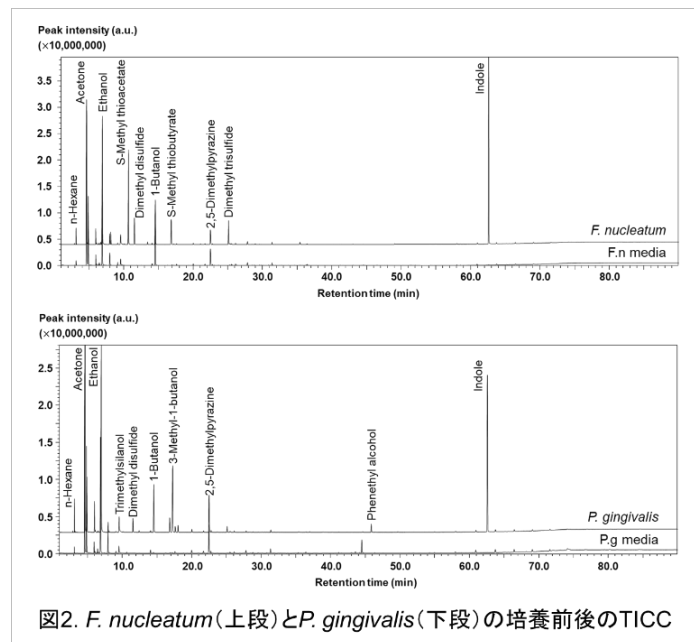


図2. *F. nucleatum*(上段)と*P. gingivalis*(下段)の培養前後のTICC

く、口臭の原因となることが知られている[1]。また、酪酸も *F. nucleatum* および *P. gingivalis* の培養上清で有意に増加した。酪酸、吉草酸、プロピオン酸などの短鎖脂肪酸は口臭の原因となることが知られており[2]、本研究の結果から *F. nucleatum* や *P. gingivalis* が酪酸産生に関与することが示唆された。*F. nucleatum* 培養上清から検出されたチオ酢酸 S-メチルと、*F. nucleatum* および *P. gingivalis* 培養上清から検出されたジメチルジスルフィドの2種のVSCは、口臭患者の唾液をインキュベートしたものからも検出されている[3]。

また、本実験は $n=4$ で実施し、検出ピークの面積値の相対標準偏差 RSD (%) を評価した。重要な口臭原因成分とされているメタンチオールは、*F. nucleatum* と *P. gingivalis* の培養上清で 70%以上であった。この結果は、歯周病菌によるメタンチオール産生量は生物学的変動が大きいことを示唆している。すなわち、メタンチオールは歯周病菌の存在を示唆する定性的なバイオマーカーであるが、定量的な議論には慎重に用いる必要があると言える。

4. まとめ

臭気閾値の低い成分は微量でも口臭に関与する可能性があるため、呼気分析において微量揮発性化合物の検出は重要である。成分濃縮を容易にできる MonoTrap とにおい嗅ぎ GC/MS 分析を用いることで、歯周病菌が産生する揮発性化合物の網羅的分析を実施することができた。本研究で検出された揮発性化合物は、口臭診断の際の測定対象成分となる可能性がある。

5. 参考文献

- [1] Hampelska, K. et al., *J. Clin. Med.*, 2020
- [2] Porter, S. R. and Scully, C., *BMJ*, 2006
- [3] Monedeiro, F. et al., *Molecules*, 2019