

## 歯周炎を有さない若年者の口臭に対する歯肉の状態と 歯垢および舌苔中細菌の関与

松井 美樹, 岸 光男

岩手医科大学歯学部口腔医学講座予防歯科学分野

(主任 : 三浦 廣行 歯学部長)

(受付 : 2013年12月11日)

(受理 : 2013年12月26日)

**目的 :** 口中気体の Volatile Sulfur Compounds (VSC) 濃度, 歯肉炎, 歯垢と舌苔試料における口腔微生物の量との間の関連性を検討することを目的とした。

**対象と方法 :** 対象者は全身的に健康な成人男性 13 名, 女性 5 名の 18 名 (平均年齢  $22.7 \pm 3.1$  歳) であり, 彼らは自発的に研究に参加した。口腔診査結果によって被験者を歯肉炎有所見者 (歯肉炎群) と歯周組織健全者 (健全群) の 2 群に分けた。ベースライン時, Winkel tongue coating index (WTCl) を評価した後にガスクロマトグラフィを用いて硫化水素 ( $H_2S$ ) とメチルメルカプタン ( $CH_3SH$ ) 濃度を測定した。続いて舌苔は舌背中央付近舌根部からマイクロスパーテルで 3 回擦過し, 歯垢は下顎両側第一大臼歯から歯科用探針を用いて全量採取した。さらに被験者は軟毛ブラシを用いて丁寧に自分の舌を清掃した。3 日後, 同様に口臭測定を行いベースラインと同一部位から歯垢と舌苔試料を採取した。採取した試料からゲノム DNA を精製し, 総細菌と *F. nucleatum* を定量するため real-time PCR に供した。

**結果 :** ベースライン時, 歯肉炎群では  $CH_3SH$  濃度, 歯垢中総細菌量が健全群よりも有意に高かった。舌清掃 3 日後には, ベースラインと比較して  $H_2S$  濃度は歯肉炎群で有意に減少していた。被験者全体では, 単相関分析において歯垢中の総細菌密度と *F. nucleatum* 量密度の間に高い相関が認められた。口中気体の VSC 濃度を目的変数とした重回帰分析では, ベースライン時の Bleeding on Probing (BOP) 歯数, 3 mm の歯周ポケットの存在, WTCl, *F. nucleatum* 密度が口中気体の VSC 濃度と有意に関連していた。

**結論 :** 口中気体の VSC 濃度は, 舌苔のみならず歯肉の状態や歯垢中細菌にも影響されることが示された。

---

Contribution of gingival conditions and bacterial levels in dental plaque and tongue coating on oral malodor of young subjects without periodontitis

Miki MATSUI and Mitsuo KISHI

Division of Preventive Dentistry, Department of Oral medicine, School of Dentistry, Iwate Medical University

(Chief : Prof. Hiroyuki MIURA, Dean of School of Dentistry)

1-3-27, Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

## 緒 言

近年, 口臭は日本のみならず, 世界中の多くの人の関心事となっている<sup>1, 2)</sup>. 口臭の主要な臭気物質は口腔に存在するタンパク質の含硫アミノ酸を基質として口腔細菌が産生する, 硫化水素 ( $H_2S$ ), メチルメルカプタン ( $CH_3SH$ ) などの口中気体揮発性硫黄化合物 (VSC) である. 歯周炎患者では歯肉縁下歯垢中に存在する歯周病原性細菌が高い VSC 産生能をもつため, 歯周炎と口臭の関連はこれまで数多く報告されてきた. さらに歯周炎患者においても歯周組織が健全な者においても舌苔と口臭の関連は極めて強い<sup>3-8)</sup>. 舌苔は口腔微生物, 剥離上皮, 唾液成分などからなる凝集物であり, 歯周組織の状態にかかわらず観察される. 近年, 歯周病患者のみならず歯周組織が健全な者の舌苔にも歯周病関連細菌が棲息していることが報告されている<sup>12-15)</sup>. *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* は歯周病と最も関連が深い細菌として Red complex と総称されるが<sup>16)</sup>, その VSC 産生能は高く<sup>8-11)</sup>, これまでに舌背上のこれら細菌について, N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamine (BANA) テストを用いた間接的方法や Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いた直接的方法により検討され, 口中気体の VSC 濃度との定性的または定量的関連が報告されている<sup>12, 14, 17-20)</sup>. それ故舌苔の除去は口臭抑制のための有効な手段と考えられている<sup>21, 22)</sup>. 一方, 歯磨きなどによる口腔清掃状態の改善が口臭を抑制することは古くから示されているにもかかわらず<sup>23-25)</sup>, 歯垢中の VSC 産生細菌と口中気体の VSC 濃度の関連を検討した例は少ない<sup>14)</sup>. また, 口腔由来の口臭は生理的口臭と歯周病由来の病的口臭に分類されるが, 後者では  $CH_3SH$  濃度の割合が高いことが知られている<sup>9)</sup>. これは,  $CH_3SH$  産生能が極めて高く Red complex に属する細菌 (Red complex 菌群) が, 深い歯周ポケットを主要な棲息部位にするためと理解されている. それ故, 病的口臭に関する

研究では深い歯周ポケットを有する歯周炎患者を対象とすることが多く, アタッチメントロスがなく歯肉の腫脹や炎症を主症状とする歯肉炎患者の口臭, 口腔細菌, 口中気体 VSC 濃度との関連についての報告はわずかであり<sup>26)</sup> また, 舌清掃の効果も明らかではない. そこで本研究では, 歯肉炎者の口中気体の VSC 濃度と, 口腔内状況および歯垢と舌苔の細菌量, 細菌密度についての関連性を定量的に検討することを目的とした. さらに舌清掃の効果はこれまで WTCI を指標としたものばかりであったが, 定量的観点から舌清掃の歯垢細菌叢に与える効果についても検討した. 細菌学的検討については総細菌量に加え, *F. nucleatum* を対象とした. *F. nucleatum* はグラム陰性嫌気性の口腔細菌であり, 歯周病と関連する細菌の 1 つと考えられており, Red complex 菌群に比しては低いものの  $H_2S$  および  $CH_3SH$  産生能を有する<sup>7)</sup>. また, 歯肉健全者にも分布し, さらに歯肉縁上, 縁下歯垢の両方から高頻度に検出される<sup>27, 28)</sup>. 加えて, *F. nucleatum* が歯垢形成過程において, レンサ球菌などの早期定着菌と晚期定着する Red complex 菌群の橋渡しをする役割を担っており<sup>16, 29)</sup>, 歯垢と舌苔の再構築過程での変化を反映する可能性がある. それ故本研究では定常状態の断面的観察に加えて, 舌苔と歯垢を除去した後の再構築過程での VSC 濃度と総細菌量, *F. nucleatum* 量の変化を観察し, それらの関連性を検討することも目的とした.

## 対象と方法

### 1. 対象および口腔診査

全身状態が健全である岩手医科大学歯学部学生有志を対象とした. 口臭測定, 細菌学的試料採取の 2 日前に口腔診査を行い, 現在歯数, 齶歯数, 近遠心頬舌側 4 点の歯周ポケットの深さ, 同部の Bleeding on Probing (BOP) を評価した. また, 口腔清掃状態を Oral Hygiene Index (OHI)<sup>30)</sup> を用いて評価した. 齶蝕の検出は WHO の診査基準<sup>31)</sup> に従った. これらの診査は事前にキャリブレーションをした 2 名の歯科医

師が行った。診査の結果、未処置歯またはアタッチメントロスを伴う4 mm以上の歯周ポケットを有する者は除外した。BOPを伴う3 mmのポケットを有する者を歯肉炎有所見者とし、それ以外の者を歯周組織健全者とした結果、9名の歯肉炎有所見者（男性8名、女性1名、平均年齢 $22.4 \pm 1.5$ 歳）と9名の歯周組織健全者（男性5名、女性4名、平均年齢 $22.9 \pm 4.3$ 歳）の合計18名（男性13名、女性5名、平均年齢 $22.7 \pm 3.1$ 歳）の研究参加者を得た。両群に平均年齢と男女比に統計学的に有意な差はなかった。また、研究参加者は、3か月以上前から抗生薬の服用、殺菌剤配合洗口剤使用の履歴をもっておらず、さらに研究実施期間中にそれらを用いないよう指示された。

## 2. 研究デザイン

はじめに舌苔スコアの評価と口中気体のVSC濃度を測定した後、歯垢と舌苔試料を採取した。さらに、被験者自身が鏡を見ながら、軟毛歯ブラシ（タフト24SS：オーラルケア、東京）を用い、Yaegakiら<sup>21)</sup>が推奨する方法によって舌清掃を行った。その後、通常の日常的口腔清掃を行い、舌清掃は行わないよう指示した。3日後に、同一被験者の舌苔スコア、口中気体VSC濃度を再測定し、その後歯垢と舌苔試料も同様に採取した。これらの測定は両日も午後4時から5時の間に行った。これ以降、舌清掃前の時点ベースライン、再調査時点を3日後と記す。

## 3. 舌苔スコア

舌苔付着量の視診による評価にはWinkel tongue coating index (WTCI)<sup>22)</sup>を用いた。これは舌背を舌尖部と舌根部に2分割し、さらに縦に3分割した6分画それぞれについて、舌苔付着状況を3段階（0：付着なし、1：薄く付着、2：厚く付着）で評価するものであり、6分画の合計スコアがWTCIスコアである。

## 4. 口中気体VSC濃度測定

口中気体VSC濃度の測定にはガスクロマトグラフィ（GC-8A、島津製作所、京都）を用い、 $H_2S$ 、 $CH_3SH$ を弁別定量した。測定3時間前

から被験者の飲食、洗口、歯口清掃を禁止した。口中気体の採取は以下に行った。すなわち長さ約6 cmに調整した内径1.1 - 1.2 mmのガラス製ヘマトクリット毛細管（日電理科硝子、神戸）の一端をパラフィルムで閉鎖し、開放したもう一端を先端にして被験者の口腔内に挿入した。前歯で軽く噛んで毛細管を固定させ、2分間の閉口鼻呼吸の後、パラフィルムで閉鎖した側からガスタイトシリンジの先端を刺入し、口中気体5 mlを吸引した。採取した気体は直ちに炎光光度検出器（FPD）を搭載したガスクロマトグラフィに注入し、VSCの成分分析を行った。VSC濃度の算出には、ガスクロマトグラフィ用ワークステーションGC solution（島津製作所、京都）を用いた。VSCの分離カラムには、Chromosorb W 80/100、7 m × 5 m × 3 m（島津GLC（株）、東京）を用いた。使用条件は、カラム温度70 - 80°C、注入口温度120°Cとし、キャリアガスとして窒素ガスを20 ml/minの流量で用いた。

## 5. 舌苔、歯垢試料の採取

ベースライン時、舌苔試料は舌背中央付近舌根部を滅菌したマイクロスパーテルで1 cm × 3回擦過することにより採取した。歯垢試料は下顎両側第一大臼歯舌側歯頸部から滅菌した歯科用探針を用いて全量採取した。3日後、舌苔、歯垢試料をベースラインと同一部位から採取した。なお、すべての被験者の歯垢採取歯面に修復物は存在していなかった。すべての試料は採取後直ちにPhosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)に懸濁し、-80°CでゲノムDNA精製までの期間冷凍保存した。

## 6. 歯垢および舌苔中細菌の定量

採取した試料からWizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega, Fitchburg, WI, USA)を用いてゲノムDNAを精製後、TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)に溶解し4°Cで保存した。DNA濃度は260 nmの吸光度を測定することにより算出した（Gene Spec III, 日立）。総細菌および*F. nucleatum*の定量には、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)]<sup>33)</sup> と, *F. nucleatum* 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)]<sup>34)</sup> をそれぞれ使い, SYBR Green real-time PCR system (Real-time PCR Thermal Cycler Dice®, タカラバイオ, 大津) により, 総細菌量, *F. nucleatum* 量を定量した. 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, タカラバイオ, 大津) 10 μl, 10 μM プライマー各 1 μl, テンプレート DNA サンプル 1 ng, および滅菌蒸留水で全量 20 μl に調整した. 95°C 30 秒の初期熱変性の後, 95°C 5 秒, 60°C 1 分の 2steps の条件により PCR を行った. 歯垢および舌苔中の細菌量は, 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は総細菌数には *Escherichia coli* ATCC 53868 (図 1A) を, *F. nucleatum* には *F. nucleatum* ATCC 25586 (図 1B) を用いた. 採取試料から抽出した全ゲノム中の 16S rRNA と *F. nucleatum* のゲノム重量 (pg) を総細菌と *F. nucleatum* それぞれの菌量とした. さらにゲノム 1 ng あたりの各ゲノム重量 (pg/ng) を総細菌と *F. nucleatum* それぞれの細菌密度とした.

#### 7. 統計解析

VSC 濃度, 細菌量は正規分布に近似させるた

め, 統計解析の際には常用対数に変換した値を用いた. 二変数間の関連の分析には Pearson の相関分析を用いた. また, ベースラインと 3 日後の平均値の差の検定には対応のある t 検定, 歯肉炎者と健全者の平均値の差の検定には Student または Welch の t 検定を用いた. さらに, VSC 濃度を目的変数とし, 他の測定項目を説明変数とした重回帰分析を行った. 変数選択にはステップワイズ変数減少法を用いた. すべての統計分析には, IBM SPSS ver. 20.0 (日本 IBM, 東京) を使用した.

#### 8. 研究倫理

すべての研究参加者に対し, 文書と口頭で研究内容を説明し, 同意書を得たうえで研究を行った. また, 研究プロトコルは事前に岩手医科大学歯学部倫理委員会に提出し, 承認を得た (承認番号 01140).

## 結 果

### 1. 口腔診査項目ならびに VSC 濃度

口腔診査時の現在歯, 処置歯, BOP, OHI の状況ならびにベースラインと 3 日後の VSC 濃度を, 歯肉炎を有する群 (歯肉炎群) と歯肉健全群 (健全群) 別に表 1 にまとめた. 事前の口腔内診査において, 歯肉炎群と健全群における現在歯数, 処置歯数に有意な差は認めなかった. また, 歯肉炎群における BOP は一人平均, 約 6 歯に見られた. 歯面への付着物量の指標である

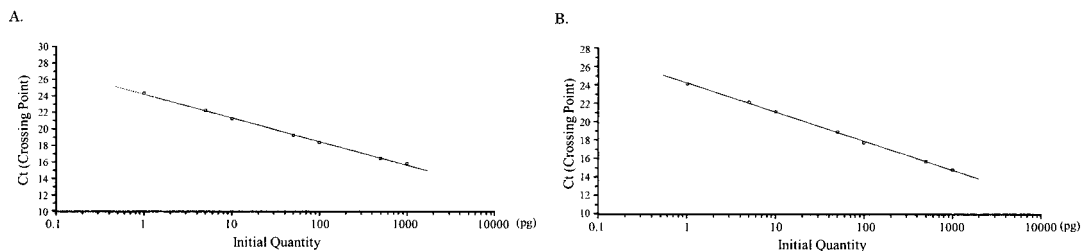


図 1 標準株から精製したゲノム DNA 量をもとに作成した細菌定量のための検量線

X 軸にゲノム濃度, Y 軸に Ct (閾値サイクル) 値を示す.

A. *E. coli* ATCC 53868 からのゲノム DNA をもとに作成した総細菌定量のための検量線.  $R^2 = 0.999$ ,  $Y = -2.868x + 24.20$ .

B. *F. nucleatum* ATCC 25586 からのゲノム DNA をもとに作成した *F. nucleatum* 定量のための検量線.  $R^2 = 0.999$ ,  $Y = -3.165x + 24.23$ .

OHI は歯肉炎群が健全群に比べて有意に高かったのに対し、舌背への付着物量を表す WTCI は、ベースライン時、3日後とも、群間で有意な差を認めず、また両群ともベースラインと3日後の間に差を認めなかった。VSC 濃度については、 $H_2S$  濃度、 $CH_3SH$  濃度ともに歯肉炎群で常に高い傾向を呈し、特にベースラインにおける  $CH_3SH$  濃度は歯肉炎群で有意に高かった。一方、ベースラインと3日後の比較では、歯肉炎群および被験者全体の  $H_2S$  濃度が3日後に有意に低かった。

2. 歯垢中と舌苔中の総細菌量および *F. nucleatum* 量

ベースラインと3日後の歯垢中ならびに舌苔中細菌の定量結果を表2にまとめた。歯垢中の総細菌に関して、細菌密度、細菌量ともにベースラインと3日後の両測定時点で歯肉炎群の方が健全群よりも有意に高い値を呈した。また、ベースラインと3日後の比較において、細菌密度が歯肉炎群および被験者全体で、細菌量が被

験者全体で、3日後の方が有意に低い値であった。これに対して舌苔中の総細菌は、歯肉炎群と健全群の間にも、測定日間にも細菌密度および細菌量の差は認められなかった。

歯垢中の *F. nucleatum* については総細菌と同様に、歯肉炎群の方が高い傾向にあったが、細菌密度、細菌量ともベースライン時に有意差を認めず、3日後に有意な差を認めた。一方、舌苔中の *F. nucleatum* は、舌苔中の総細菌と同様に歯肉炎群と健全群の間、測定日間の差を認めなかった。

3. VSC 濃度、口腔内状況ならびに細菌量相互の関連

表3に、被験者全体の VSC 濃度、口腔内状況ならびに細菌量相互の関連について測定日別に示した。総細菌、*F. nucleatum* の、細菌密度と細菌量はいずれも高い相関があったため（歯垢：総細菌密度対総細菌量； $r = 0.980$ 、*F. nucleatum* 密度対 *F. nucleatum* 量； $r = 0.984$ 、舌苔：総細菌密度対総細菌量； $r = 0.949$ 、*F.*

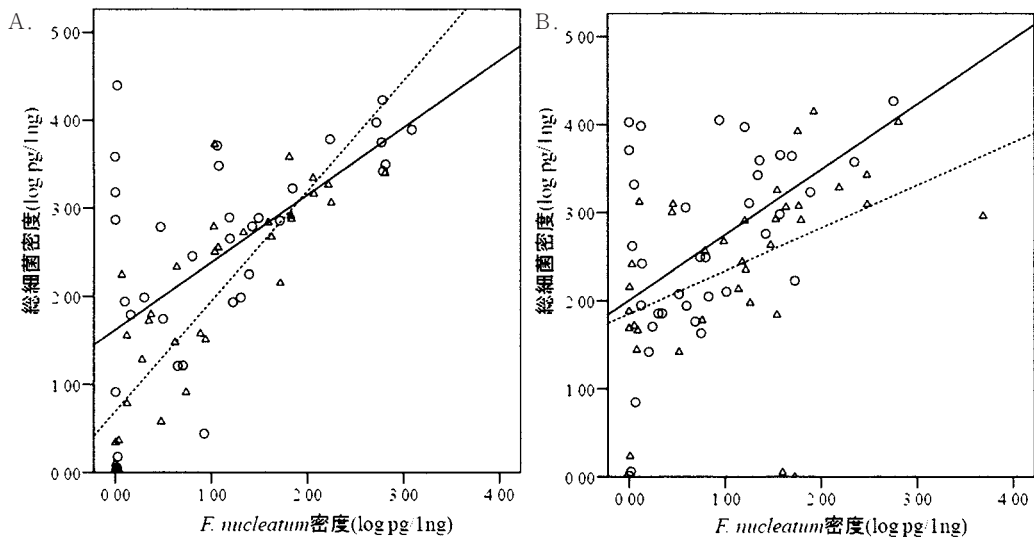


図2 歯垢および舌苔中の総細菌密度と *F. nucleatum* 密度との関連

- A. 歯垢
- B. 舌苔

○ ベースライン時の分布, △ 3日後の分布.

— ベースライン時の回帰直線, ..... 3日後の回帰直線.

横軸に *F. nucleatum* 密度 (log pg/1 ng), 縦軸に総細菌密度 (log pg/1 ng) をとり、歯垢と舌苔それぞれについてベースライン時と3日後の分布を示した。



表1 歯肉炎群と健全群における口腔内状況ならびに VSC 濃度<sup>a</sup>

		ベースライン	3 日後	p 値 <sup>c</sup>
現在歯数	歯肉炎群 (N=9)	26.9±2.47	-	-
	健全群 (N=9)	28.3±1.58	-	-
	全被験者(N=18)	27.6±2.15	-	-
	p 値 <sup>d</sup>	0.159	-	-
処置歯数	歯肉炎群	6.11±7.32	-	-
	健全群	3.67±5.63	-	-
	全被験者	4.89±6.46	-	-
	p 値 <sup>d</sup>	0.439	-	-
BOP 歯数 <sup>b</sup>	歯肉炎群	6.00±5.70	-	-
	健全群	0.00	-	-
	全被験者	3.00±4.98	-	-
	p 値 <sup>d</sup>	0.013	-	-
OHI	歯肉炎群	2.26±1.11	-	-
	健全群	0.76±0.81	-	-
	全被験者	1.51±1.21	-	-
	p 値 <sup>d</sup>	0.005	-	-
WTCI	歯肉炎群	5.00±2.65	5.67±3.78	0.606
	健全群	6.22±3.15	5.67±2.96	0.523
	全被験者	5.61±2.89	5.67±3.29	0.929
	p 値 <sup>d</sup>	0.386	0.900	
H <sub>2</sub> S (log ppb)	歯肉炎群	2.06±1.29	1.28±1.33	0.026
	健全群	1.40±1.40	0.92±1.12	0.236
	全被験者	1.73±1.35	1.10±1.20	0.015
	p 値 <sup>d</sup>	0.316	0.544	
CH <sub>3</sub> SH (log ppb)	歯肉炎群	1.33±1.02	0.90±1.12	0.351
	健全群	0.39±0.81	0.19±0.57	0.216
	全被験者	0.86±1.02	0.54±0.93	0.179
	p 値 <sup>d</sup>	0.046	0.117	

<sup>a</sup> 数値は平均値±標準偏差を表す。現在歯数、処置歯数、BOP ならびに OHI はベースラインの 2 日前に評価した。

<sup>b</sup> プロービング時に出血を呈した歯数。

<sup>c</sup> ベースラインと舌清掃 3 日後の比較 (対応のある t 検定による)。

<sup>d</sup> 各測定時点における歯肉炎群と健全群の比較 (Student または Welch の t 検定による)。

表2 歯肉炎群と健全群における歯垢と舌苔中総細菌ならびに *F. nucleatum* 量<sup>a</sup>

		ベースライン	3日後	p値 <sup>f</sup>
歯垢総細菌密度 <sup>b</sup>	歯肉炎群 (N=9)	3.04±1.13	2.63±1.17	0.008
	健全群 (N=9)	1.49±1.53	1.07±1.24	0.149
	全被験者(N=18)	2.27±1.53	1.85±1.42	0.039
	p値 <sup>g</sup>	0.026	0.014	
歯垢総細菌量 <sup>c</sup>	歯肉炎群	4.30±1.65	3.31±1.68	0.094
	健全群	2.10±2.25	1.37±1.43	0.220
	全被験者	3.20±2.23	2.34±1.81	0.004
	p値 <sup>g</sup>	0.031	0.018	
舌苔総細菌密度 <sup>b</sup>	歯肉炎群	2.54±1.29	2.30±1.10	0.383
	健全群	2.81±1.08	2.26±1.11	0.337
	全被験者	2.68±1.16	2.28±1.07	0.300
	p値 <sup>g</sup>	0.649	0.944	
舌苔総細菌量 <sup>c</sup>	歯肉炎群	3.79±1.80	3.21±1.48	0.576
	健全群	3.88±1.62	2.96±1.10	0.413
	全被験者	3.83±1.66	3.09±1.43	0.179
	p値 <sup>g</sup>	0.899	0.729	
歯垢 <i>F. nucleatum</i> 密度 <sup>d</sup>	歯肉炎群	1.46±1.19	1.50±0.80	0.710
	健全群	0.60±0.93	0.35±0.65	0.098
	全被験者	1.03±1.13	0.92±0.92	0.685
	p値 <sup>g</sup>	0.105	0.004	
歯垢 <i>F. nucleatum</i> 量 <sup>e</sup>	歯肉炎群	2.44±1.96	2.16±0.52	0.947
	健全群	1.12±1.75	0.52±0.86	0.094
	全被験者	1.78±1.93	1.34±1.30	0.270
	p値 <sup>g</sup>	0.153	0.004	
舌苔 <i>F. nucleatum</i> 密度 <sup>d</sup>	歯肉炎群	0.71±0.70	1.19±0.95	0.877
	健全群	0.79±0.80	1.26±1.18	0.446
	全被験者	0.75±0.73	1.23±1.04	0.121
	p値 <sup>g</sup>	0.823	0.898	
舌苔 <i>F. nucleatum</i> 量 <sup>e</sup>	歯肉炎群	1.54±1.53	1.64±1.33	0.223
	健全群	1.62±1.14	2.14±1.80	0.355
	全被験者	1.58±1.31	1.90±1.55	0.497
	p値 <sup>g</sup>	0.905	0.515	

<sup>a</sup>数値は平均値±標準偏差を表す。

<sup>b</sup>採取試料から抽出したゲノム 1 ng 中の総細菌ゲノム重量(pg)の対数変換値。

<sup>c</sup>採取試料から抽出した全ゲノム中の総細菌ゲノム重量(pg)の対数変換値。

<sup>d</sup>採取試料から抽出したゲノム 1 ng 中の *F. nucleatum* ゲノム重量(pg)の対数変換値。

<sup>e</sup>採取試料から抽出した全ゲノム中の *F. nucleatum* ゲノム重量(pg)の対数変換値。

<sup>f</sup>ベースラインと舌清掃3日後の比較 (対応のある t 検定による)。

<sup>g</sup>各測定時点における歯肉炎群と健全群の比較 (Student または Welch の t 検定による)。

*nucleatum* 密度対 *F. nucleatum* 量 ;  $r = 0.895$ ), 本分析以降, 細菌密度を細菌学的指標として分析に充てた. ベースラインと3日後および2回の測定をまとめたいずれの場合においても有意な関連が見られた測定項目の組合せは,  $H_2S$  濃度と  $CH_3SH$  濃度, 歯垢中総細菌密度と 3 mm 以上のポケットの存在および OHI, 歯垢中総細菌密度と歯垢中 *F. nucleatum* 密度であった. 一方, 舌苔においては総細菌密度と *F. nucleatum* 細菌密度の間にある程度高い相関を認めたものの, 有意ではなかった. 歯垢中ならびに舌苔中の総細菌密度と *F. nucleatum* 密度の関連を図示する (図 2). さらに, ベースラインで有意な相関が認められ, 3日後に有意でなかったのは,  $CH_3SH$  濃度と 3 mm 以上のポケットの存在, WTCI と舌苔中 *F. nucleatum* 密度であり, 反対にベースラインでは有意ではなかったが3日後に有意な相関を呈したのは, 歯垢中 *F. nucleatum* 密度と BOP 歯数および 3 mm 以上のポケットの存在, OHI であった.

#### 4. 口中気体の VSC 濃度を目的変数とした重回帰分析

口臭と口腔内状況ならびに歯垢, 舌苔中の細菌の関連を分析するため, 被験者全体のデータを用いて,  $H_2S$  濃度と  $CH_3SH$  濃度を目的変数とした重回帰分析を行った. 説明変数には, 処置歯数, BOP 歯数, 3 mm のポケットの存在 (ポケットなし:0, ポケットあり:1), OHI, WTCI, 歯垢の総細菌および *F. nucleatum* の密度, 舌苔の総細菌および *F. nucleatum* の密度とした. ステップワイズ変数減少法による変数選択を行ったところ, ベースライン時の  $H_2S$  濃度と関連したのは BOP 歯数, OHI スコアおよび歯垢中 *F. nucleatum* 密度であった. このうち OHI スコアは負の偏回帰係数を呈していた. また, ベースライン時の  $CH_3SH$  濃度と関連したのは BOP 歯数, 3 mm のポケットの存在, OHI, WTCI および歯垢中 *F. nucleatum* 密度であり, OHI スコアの偏回帰係数のみ負の値を呈していた. これらの関連要因はベースラインと3日後を合計した回帰モデルについても同様で

あった. 一方, 3日後のみの回帰モデルでは,  $H_2S$  濃度と  $CH_3SH$  濃度のいずれにおいても選択された変数はなかった.

## 考 察

本研究において, 歯垢中の総細菌は歯肉炎群の方が健全群に比べて, ベースライン, 3日後の両時点で量, 密度ともに高かった. 一方, 舌苔の付着量を視診で評価した WTCI と舌苔中の総細菌密度, 量は歯肉炎群, 健全群の差も測定日の差も見られなかった (表 1, 2). Ch'ere<sup>35)</sup> らは, 舌苔は除去しても2日後には視診では, ほぼベースラインに回復することを報告している. また, 舌苔の機械的除去による舌背表面の細菌数の減少量は低い<sup>36-38)</sup> ことも報告されており, 本実験はそれら研究結果と一致している. 歯垢の形成については, 本研究では被験者に日常的な口腔清掃を禁止していないため, ブラッシングの影響が無視できない. しかし, 被検歯面から採取された歯垢を日常的な磨き残しと考えると, 本研究結果は, 舌苔が歯垢に比べてより速やかに再付着すること, 歯垢再付着速度は, 日常的に清掃不良の者の方が速いことを示唆している.

またベースラインの口中気体 VSC 濃度において, 歯肉炎群と健全群で  $H_2S$  濃度に差がなかった. しかし,  $CH_3SH$  濃度は歯肉炎群の方が高く ( $p = 0.046$ ), 有意ではないものの同様の傾向が3日後にも認められた ( $p = 0.117$ ) (表 1). Tanner<sup>15)</sup> らは, PCR 法を用いて, 歯肉炎を有する者の歯肉溝と舌から *P. gingivalis* や *T. forsythensis* を検出しており, それらの検出頻度は, ある程度進行した歯肉炎になると *P. gingivalis* で歯肉溝, 舌ともに 40 % 程度, *T. forsythensis* では歯肉溝 30 %, 舌で 10 % 程度と, 歯肉炎の段階でもそれら細菌が決して無視できない頻度で分布していることを報告している. 我々の結果と合わせて考えると, 重度の歯周炎ではない, 歯肉炎者においても, *P. gingivalis* や *T. forsythensis* などの  $CH_3SH$  産生能が高い歯周病原性細菌が, 個人の口臭に影



表3 VSC 濃度、口腔内状況ならびに細菌量相互の単相関分析<sup>a</sup>

	H <sub>2</sub> S	CH <sub>3</sub> SH	BOP 歯数	ポケット <sup>b</sup>	OHI	WTCI	歯垢総細菌 <sup>c</sup>	舌苔総細菌 <sup>d</sup>	歯垢 F. n. <sup>e</sup>	舌苔 F. n. <sup>f</sup>
H <sub>2</sub> S	1.000									
CH <sub>3</sub> SH	0.745** 0.572* 0.678**	1.000								
BOP 歯数	0.111 0.164 0.132	0.292 0.215 0.252	1.000							
ポケット <sup>b</sup>	0.250 0.153 0.198	0.476* 0.390 0.428**	0.620 <sup>a</sup> **	1.000						
OHI	-0.117 -0.102 -0.106	0.102 0.101 0.100	0.742 <sup>a</sup> **	0.635 <sup>a</sup> **	1.000					
WTCI	0.004 0.030 0.015	0.013 0.330 0.170	-0.302 -0.039 -0.162	-0.217 0.001 -0.101	0.138 0.114 0.125	1.000				
歯垢総細菌 <sup>c</sup>	0.203 0.092 0.102	0.331 0.052 0.221	0.170 0.379 0.267	0.522* 0.567* 0.537*	0.510* 0.644** 0.568**	0.193 0.103 0.144	1.000			
舌苔総細菌 <sup>d</sup>	0.016 0.366 0.105	0.200 -0.242 0.028	-0.314 -0.211 -0.260	-0.115 0.018 -0.050	-0.127 -0.119 -0.121	0.424 0.009 0.205	0.433 0.204 0.345*	1.000		
歯垢 F. n. <sup>e</sup>	0.344 0.164 0.138	0.444 0.189 0.338*	0.053 0.502* 0.253	0.395 0.642** 0.503**	0.428 0.675** 0.535**	0.298 0.191 0.242	0.712** 0.846** 0.767**	0.269 0.135 0.217	1.000	
舌苔 F. n. <sup>f</sup>	-0.037 0.166 0.005	0.141 0.142 0.088	0.035 -0.241 -0.121	-0.057 -0.032 -0.040	0.163 -0.251 -0.076	0.476* 0.055 0.210	0.196 -0.361 -0.150	0.306 0.340 0.254	0.135 -0.281 -0.096	1.000

<sup>a</sup>1 段目の数値はベースライン (N=18) での相関係数, 2 段目の数値は歯垢, 舌苔除去 3 日後 (N=18) の相関係数, 3 段目の数値は 2 回の測定を合計した (N=36) 数値を表す. \*p<0.05, \*\*p<0.01. 現在歯数, 処置歯数, BOP ならびに OHI はベースラインの 2 日前に評価した数値を使用した.  
<sup>b</sup>3 mm のポケット (ポケットなし: 0, ポケットあり: 1). <sup>c-f</sup>各試料中の細菌密度. <sup>e</sup>F. n.: *F. nucleatum*.

響を及ぼすものと考えられる。一方、H<sub>2</sub>S に関しては舌苔除去 3 日後の歯肉炎群でベースラインよりも有意に低い値を呈した。舌苔除去の口臭抑制効果の持続時間は 30 分程度という報告<sup>39)</sup>があり、今回観察された H<sub>2</sub>S レベルの減少はそれに比してあまりに長期間といえる。しかし、歯肉健全者ではそのような減少は見られなかったことから、口腔清掃状態が不良の場合の方が、日常的に清掃状態良好な場合に比べて舌清掃の口臭抑制効果が著明に現れるのかもしれない。

本研究では *F. nucleatum* が歯肉炎群の歯垢中に多く観察され、3 日後には有意であった。また、3 日後に、健全群で *F. nucleatum* 密度がベースラインより低い傾向にある (p = 0.098) のに対して、歯肉炎群ではベースラインと同等であった。さらに、歯垢中の *F. nucleatum* 密度は、総細菌密度が増加するのに伴って増加し

ていた (表 3, 図 2)。一方、前述のようにベースライン時に歯肉炎群で CH<sub>3</sub>SH 濃度が高く、被験者全体における歯垢中 *F. nucleatum* 密度は単相関分析で CH<sub>3</sub>SH 濃度とある程度の相関 (r = 0.444, p = 0.065) が認められた。さらに CH<sub>3</sub>SH 濃度を目的変数とする重回帰分析では H<sub>2</sub>S 濃度と CH<sub>3</sub>SH 濃度のいずれについても歯垢中 *F. nucleatum* 密度は有意な説明変数として選択された (表 4)。これらの理由として *F. nucleatum* 自体がある程度の VSC 産生能をもつことが挙げられ、加えて、この細菌が Red complex 菌群の歯垢への定着を促す特徴を持つ<sup>16, 29)</sup>ことが考えられる。すなわち、歯肉炎を有する者の歯垢は、定常状態においても、再付着途中においても、歯肉健全者のそれに比べて、総細菌量が多く、それに伴い *F. nucleatum* も増加することで Red complex 菌群の定着が促進される。その結果、*F. nucleatum* やさらに

表4 VSC濃度を目的変数とした重回帰分析結果

目的変数		選択された変数 <sup>a</sup>	偏回帰係数	標準化偏回帰係数	p値	
H <sub>2</sub> S	ベースライン (N=18)	BOP 歯数	0.246	0.912	0.014	
		OHI	-1.27	-1.15	0.007	
		歯垢 F.n. <sup>b</sup>	0.542	0.777	0.007	
	3日後 (N=18)		なし			
	合計 (N=36)	BOP 歯数	0.170	0.643	0.012	
		OHI	-0.889	-0.818	0.006	
		歯垢 F.n. <sup>b</sup>	0.350	0.441	0.029	
	CH <sub>3</sub> SH	ベースライン (N=18)	BOP 歯数	0.227	1.113	0.004
			ポケット	1.173	0.593	0.021
OHI			-1.221	-1.458	0.001	
WTCl			0.172	0.488	0.034	
			歯垢 F.n. <sup>b</sup>	0.337	0.639	0.008
3日後 (N=18)			なし			
合計 (N=36)		BOP 歯数	0.110	0.551	0.029	
		ポケット	0.973	0.506	0.016	
		OHI	-0.696	-0.854	0.003	
	WTCl	0.107	0.334	0.037		
	歯垢 F.n. <sup>b</sup>	0.203	0.341	0.070		

<sup>a</sup> 処置歯数, BOP 歯数, ポケット; 3 mm のポケット (ポケットなし: 0, ポケットあり: 1), OHI, WTCl, 歯垢の総細菌および *F. nucleatum* の密度対数値, 舌苔の総細菌および *F. nucleatum* の密度対数値, を説明変数として投入後、ステップワイズ変数減少法の最終モデルで選択された変数を示す。現在歯数, 処置歯数, BOP ならびに OHI はベースライン時の値を使用した。

<sup>b</sup>F. n.: *F. nucleatum*.

VSC 産生能の高い Red complex 菌群が口中に CH<sub>3</sub>SH を産生することが推察された。

口中気体の VSC 濃度には多要因が複雑に関与している<sup>40)</sup> ため, VSC 濃度を目的変数とした重回帰分析を行った。その結果, ベースラインにおいて, 臨床所見では BOP 歯数, 3 mm 以上のポケットという歯肉炎症状が H<sub>2</sub>S 濃度, CH<sub>3</sub>SH 濃度の両方と関連した。また細菌の測定値では先に述べたように歯垢の *F. nucleatum* 密度と H<sub>2</sub>S 濃度および CH<sub>3</sub>SH 濃度とが関連した。これに対し, 歯の付着物の指標

である OHI はベースラインにおいて H<sub>2</sub>S 濃度, CH<sub>3</sub>SH 濃度の両方と負の関連が示された (表 4)。OHI が負の関連を示した理由としては唾液流量や生活習慣, ストレスといった他の要因との間接的関連が予想されるが本研究から明らかにすることはできない。しかし, 歯垢中の *F. nucleatum* 密度と CH<sub>3</sub>SH 濃度との関連から, 歯垢は付着量よりも, そこに存在する細菌の種類といった質的な要因が VSC 濃度に影響を与えることが示唆された。また, WTCl が CH<sub>3</sub>SH 濃度と関連したことはこれまで, 数多

く報告されてきた舌苔付着量と口中気体の VSC 濃度との関連<sup>41-43)</sup>と一致する。本研究の対象者数は各群 9 名ずつと、決して十分とはいえない。また直接的に Red complex 菌群を評価していないため、それらの動向はあくまでも *F. nucleatum* の定量結果から推測したに過ぎない。今後、対照群を設けた同様の実験を、対象者数を増やし、長期的に直接 Red complex 菌群の測定を含めて行う必要がある。一方、今回得られた結果は、歯肉炎者の歯垢には *F. nucleatum* が多く存在し、*F. nucleatum* 自体あるいは *F. nucleatum* が定着を促す VSC 産生細菌の増加が、個人の口臭強度に関与することを示しており、歯磨きによる口臭抑制に関して根拠を提示したものと考え、口臭抑制効果が認められている舌清掃は一般に、口腔保健に関心が高く、すでに歯磨き行動は十分確立されている者が歯磨きに加えて行う傾向にある<sup>44)</sup>。歯磨きの口臭抑制効果を示唆した本研究結果は、歯磨き行動が不十分な者に対する歯磨きの動機付けのために有用な情報であると考えられた。

#### 謝辞ならびに利益相反について

稿を終えるにあたり、研究のための環境を整え、常にご支援くださいました、口腔医学講座予防歯科学分野 米満正美前教授、口腔医学講座予防歯科学分野教授代行 三浦廣行歯学部長に心よりお礼申し上げます。研究の遂行に際し、終始、懇篤なるご指導とご高閲を賜りました生化学講座細胞情報科学分野 帖佐直幸先生に心より感謝申し上げます。また、細菌学的検討方法について丁寧なるご指導を賜りました微生物学講座分子微生物学分野 下山佑先生に謹んで感謝の意を表します。さらに、研究に対して数々のご助言とご教示をいただきました、微生物学講座分子微生物学分野 木村重信教授に深く感謝いたします。最後に、絶えず暖かいご支援とご協力をいただきました口腔医学講座予防歯科学分野の諸先生に心より感謝いたします。本研究の一部は、文部科学省科学研究費補

助金 (C ; No. 22592343)、公益財団法人富徳会口腔衛生学部門研究者助成により実施された。また本研究は利益相反に相当する事項はない。なお、本論文の要旨の一部は、第 61 回日本口腔衛生学会・総会 (平成 24 年 5 月 25 日~27 日、神奈川) において発表した。

#### 引用文献

- 1) 平成 11 年保健福祉動向調査の概況 : 厚生省 (現厚生労働省) 大臣官房統計情報部, 厚生労働省ホームページ, [http://www1.mhlw.go.jp/toukei/h11hftyosa\\_8/](http://www1.mhlw.go.jp/toukei/h11hftyosa_8/) (参照 2013-12-05)
- 2) Eli, I., Baht, R., Koriati, H. and Rosenberg, M.: Self-perception of breath odor. J Am Dent Assoc., 132: 621-626, 2001.
- 3) Delanghe, G., Ghyselen, J., Van Steenberghe, D. and Feenstra L.: Multidisciplinary breath-odour clinic. Lancet 350: 187, 1997.
- 4) Tonzetich, J.: Production and origin of oral malodor. Periodontol., 28:13-20, 1977.
- 5) Schmidt, N. F., Missan, S. R. and Tarbet, W. J.: The correlation between organoleptic mouth-odor ratings and levels of volatile sulfur compounds. Oral Surg Oral Med Oral Pathol., 45: 560-567, 1978.
- 6) Yaegaki, K. and Sanada K.: Biochemical and clinical factors influencing oral malodor in periodontal patients. J Periodontol., 63: 783-789, 1992.
- 7) Persson, S., Edlund, M. B., Claesson, R. and Carlsson, J.: The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. Oral Microbiol Immunol., 5: 195-201, 1990.
- 8) Kleinberg, I. and Westbay, G.: Oral malodor. Crit Rev Oral Biol Med., 1: 247-259, 1990.
- 9) Yaegaki, K. and Sanada, K.: Volatile sulfur compounds in mouth air from clinically healthy subjects and patients with periodontal disease. J Periodont Res., 27: 233-238, 1992.
- 10) Tonzetich, J. and Ng S. K.: Reduction of malodor by oral cleansing procedures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol., 42: 172-181, 1976.
- 11) Miyazaki, H., Sakao, S., Katoh, Y. and Takehara, T.: Correlation between volatile sulphur compounds and certain oral health measurements in the general population. J Periodontol., 66: 679-684, 1995.
- 12) Kishi, M., Kimura, S., Ohara-Nemoto, Y., Kishi, K., Aizawa, F., Moriya, T. and Yonemitsu, M.: Oral malodor and periodontopathic microorganisms in tongue coat of periodontally healthy subjects. Dent Jpn., 38:24-28, 2002.
- 13) Cortelli, J. R., Aquino, D. R., Cortelli, S. C., Fernandes, C. B., de Carvalho-Filho, J., Franco, G. C., Costa, F. O. and Kawai, T.: Etiological analysis of initial

- colonization of periodontal pathogens in oral cavity. J Clin Microbiol., 46:1322-1329, 2008.
- 14) Kishi, M., Ohara-Nemoto, Y., Takahashi, M., Kishi, K., Kimura, S., Aizawa, F., Yonemitsu M: Prediction of periodontopathic bacteria in dental plaque of periodontal healthy subjects by measurement of volatile sulfur compounds in mouth air. Arch Oral Biol., 58:324-330, 2013.
  - 15) Tanner, A. C., Paster, B. J., Lu S. C., Kanasi, E., Kent, R. Jr., Van Dyke, T. and Sonis, S. T.: Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis. J Dent Res., 85: 318-323, 2006.
  - 16) Socransky, S. S. and Haffajee, A. D.: Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontology 2000 28: 12-55, 2002.
  - 17) Tanaka, M., Yamamoto, Y., Kuboniwa, M., Nonaka, A., Nishida, N., Maeda, K., Kataoka, K., Nagata, H. and Shizukuishi, S.: Contribution of periodontal pathogens on tongue dorsa analyzed with real-time PCR to oral malodor. Microbes Infect., 6: 1078-1083, 2004.
  - 18) Riggio, M. P., Lennon, A., Rolph, H. J., Hodge, P. J., Donaldson, A., Maxwell, A. J. and Bagg, J.: Molecular identification of bacteria on the tongue dorsum of subjects with and without halitosis. Oral Dis., 14: 251-258, 2008.
  - 19) Kozlovsky, A., Gordon, D., Gelernter, I., Loesche, W. J. and Rosenberg M.: Correlation between the BANA test and oral malodor parameters. J Dent Res., 73:1036-1042, 1994.
  - 20) Pham TA.: Comparison between self-estimated and clinical oral malodor. Acta Odontol Scand., 71: 263-270, 2013.
  - 21) Christensen, G. J.: Why clean your tongue. J Am Dent Assoc., 129:1605-1607, 1998.
  - 22) Yaegaki, K., Coil, J. M., Kamemizu, T. and Miyazaki, H.: Tongue brushing and mouth rinsing as basic treatment measures for halitosis. Int Dent J., 52 Suppl 3:192-196J, 2002.
  - 23) Tonzetich, J.: Direct gas chromatographic analysis of sulphur compounds in mouth air in man. Arch Oral Biol., 16: 587-597, 1971.
  - 24) Morris, P. P. and Read, R. R.: Halitosis: variations in mouth and total breath odor intensity resulting from prophylaxis and antiseptics. J Dent Res., 28: 324-333, 1949.
  - 25) Williams, M. I., Vazquez, J. and Cummins, D.: Clinical comparison of a new manual toothbrush on breath volatile sulfur compounds. Compend Contin Educ Dent. 10 Suppl., 2: 22-27, 2004.
  - 26) Pham, T. A., Ueno, M., Zaitu, T., Takehara, S., Shinada, K., Lam, P. H. and Kawaguchi, Y.: Clinical trial of oral malodor treatment in patients with periodontal diseases. J Periodont Res., 46: 722-729, 2011.
  - 27) Chew J, Zilm PS, Fuss JM, Gully NJ: *A proteomic investigation of Fusobacterium nucleatum* alkaline-induced biofilms. BMC Microbiol., 12: 189-202, 2012.
  - 28) Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D: Role of *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. Curr Issues Mol Biol., 13: 25-36, 2011.
  - 29) Kolenbrander, P. E. and London, J.: Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. J Bacteriol., 175: 3247-3252, 1993.
  - 30) Greene, J. C. and Vermillion, J. R.: The Oral Hygiene Index. A method for classifying oral hygiene status. J Am Dent Assoc., 61: 172-179, 1960.
  - 31) World Health Organization: Oral health surveys basic methods. 4th edition. Geneva: World Health Organization, 1997.
  - 32) Winkel, E. G., Roldán, S., Van Winkelhoff, A. J., Herrera, D. and Sanz, M.: Clinical effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc-lactate on oral halitosis. J Clin Periodontol., 30: 300-306, 2003.
  - 33) Yang, S., Lin, S., Kelen, G. D., Quinn, T. C., Dick, J. D., Gaydos, C. A. and Rothman, R. E.: Quantitative multiprobe PCR assay for simultaneous detection and identification to species level of bacterial pathogens. J Clin Microbiol., 40: 3449-3454, 2002.
  - 34) Saygun, I., Kubar, A., Sahin, S., Sener, K. and Slots, J.: Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. J Periodont Res., 43: 352-359, 2008.
  - 35) Chérel, F., Mobilia, A., Lundgren, T., Stephens, J., Kiger, R., Riggs, M. and Egelberg J: Rate of reformation of tongue coatings in young adults. Int J Dent Hyg., 6: 371-375, 2008.
  - 36) Quirynen, M., Avontrodt, P., Soers, C., Zhao, H., Pauwels, M. and van Steenberghe, D.: Impact of tongue cleansers on microbial load and taste. J Clin Periodontol., 31: 506-510, 2004.
  - 37) Quirynen, M., Zhao, H., Soers, C., Dekeyser, C., Pauwels, M., Coucke, W. and Steenberghe, D.: The impact of periodontal therapy and the adjunctive effect of antiseptics on breath odorrelated outcome variables: a double blind randomized study. J Periodontol., 76: 705-712, 2005.
  - 38) Bordas, A., McNab, R., Staples, A. M., Bowman, J., Kanapka, J. and Bosma, M. P.: Impact of different tongue cleaning methods on the bacterial load of the tongue dorsum. Arch Oral Biol 53(Suppl 1):S13-18, 2008.
  - 39) Seemann, R., Kison, A., Bizhang, M. and Zimmer, S.: Effectiveness of mechanical tongue cleaning on oral levels of volatile sulfur compounds. J Am Dent Assoc., 132: 1263-1267, 2001.
  - 40) Scully, C. and Greenman, J.: Halitosis (breath odor) Periodontology 2000. 48: 66-75, 2008.
  - 41) Danser, M. M., Mantilla Gomez, S. and Van der Weijden, G. A.: Tongue coating and tongue brushing: a literature review. Int J Dent Hyg., 1:

- 151-158, 2003.
- 42) Oho, T., Yoshida, Y., Shimazaki, Y., Yamashita Y. and Koga T.: Characteristics of patients complaining of halitosis and the usefulness of gas chromatography for diagnosing halitosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 91: 531-534, 2001.
- 43) Morita, M. and Wang, H-L.: Association between oral malodor and adult periodontitis. *J Clin Periodontol.*, 28: 813-819, 2001.
- 44) Kishi, M., Namioka, T., Oonodera, N., Aizawa, F., Sekine, M. and Yonemitsu M.: Prevalence of tongue cleaning habit and related factors in healthy individuals in Iwate Prefecture, Japan. *J Dent Hlth.*, 62: 14-22, 2012.



**研 究**

## Contribution of gingival conditions and bacterial levels in dental plaque and tongue coating on oral malodor of young subjects without periodontitis.

Miki MATSUI, Mitsuo KISHI

(Chief: Prof. Hiroyuki MIURA, Dean of School of Dentistry)

[Received : December 11, 2013 : Accepted : December 26, 2013]

### Abstract

**Aim:** The aim of this study was to investigate the relationships between volatile sulfur compounds (VSC) levels in mouth air, gingival conditions and amount of oral microorganisms in samples of dental plaque and tongue coating in young subjects without periodontitis.

**Subjects and methods:** Eighteen systemic healthy young adults consisted of 13 males and 5 females (mean age:  $22.7 \pm 3.1$  yrs.) voluntarily participated in this study. After oral examinations, they were divided into 2 groups by their gingival conditions (gingivitis group and healthy group). At baseline, concentrations of hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) and methyl mercaptan ( $CH_3SH$ ) in mouth air were measured using a gas chromatography after assessing the tongue coating score using the Winkel tongue coating index (WTCl). Subsequently, tongue coating were collected from the posterior of tongue dorsum and dental plaque was collected from the first molar lingual surfaces on both sides of the mandibular. Then, subjects cleaned their tongue thoroughly with soft toothbrush. After 3 days, the same measurement and sample collection were carried out. Oral samples were applied to real-time PCR assay to determine the amounts of total bacteria and *Fusobacterium nucleatum*. This study protocol was approved by the Ethical Committee of Iwate Medical University School of Dentistry.

**Results:** At baseline,  $CH_3SH$  concentration, and total amounts of bacteria in plaque samples were significantly higher in the gingivitis group. Three days after the tongue cleaning,  $H_2S$  concentration was reduced compared to the baseline in the gingivitis group. For all subjects, there was a significant single correlation between amounts of total bacteria and *F. nucleatum* in dental plaque. Multiple linear regression analysis revealed that bleeding from gingiva on probing, periodontal pocket with 3 mm depth, WTCl and the amount of *F. nucleatum* were significantly related with VSC levels in mouth air.

**Conclusion:** VSC concentrations in mouth air are depend on gingival conditions and bacterial levels in dental and, as well as tongue coating.

**Key Words :** oral malodor, volatile sulfur compounds (VSC), dental plaque, tongue coating, gingivitis