



## キシリトール溶液による洗口が機械的歯面清掃後の 口腔細菌叢に及ぼす影響

米 永 崇 利   岩 井 浩 明   東   哲 司  
笹 井 保 之   小 松 芳 成   友 藤 孝 明

朝日大学歯学部口腔感染医療学講座社会口腔保健学分野  
〒 501-0296 岐阜県瑞穂市穂積 1851

Effects of mouthwash with xylitol solution on oral microbiome

YONENAGA TAKATOSHI, IWAI KOMEI, AZUMA TETSUJI,  
SASAI YASUYUKI, KOMATSU YOSHINARI, TOMOFUJI TAKAAKI

*Department of Community Oral Health, Division of Oral Infections and Health Sciences, School of Dentistry, Asahi University  
1851 Hozumi Mizuho-city Gifu Japan 501-0296*

原 著

キシリトール溶液による洗口が機械的歯面清掃後の  
口腔細菌叢に及ぼす影響

米 永 崇 利 岩 井 浩 明 東 哲 司  
笹 井 保 之 小 松 芳 成 友 藤 孝 明

Effects of mouthwash with xylitol solution on oral microbiome

YONENAGA TAKATOSHI, IWAI KOMEI, AZUMA TETSUJI,  
SASAI YASUYUKI, KOMATSU YOSHINARI, TOMOFUJI TAKAAKI

キシリトールは、歯周病原性細菌の増殖を抑える効果があることが知られている。本研究では、Professional mechanical tooth cleaning (PMTC) 後のキシリトール溶液洗口は、口腔細菌叢（口腔マイクロバイオーム）の構成に影響を与えるのではないのかという仮説を立て、キシリトール溶液洗口の効果を経時的に検討することを目的とした。10名の歯肉が健康な学生が被験者に選ばれた。PMTCを行った後、蒸留水による洗口を、1日1回の頻度で7日間行った。3か月以上の間隔を空けた後、今度は10%キシリトール溶液による洗口を、1日1回の頻度で7日間行った。PMTC前（ベースライン）と、PMTCを行ってから1日後、3日後、7日後に、下顎第1、2大臼歯歯間部の歯肉溝滲出液を採取し、歯肉溝滲出液中のマイクロバイオームを、次世代シーケンサーを用いて分析した。ベースライン時の歯肉溝滲出液中の細菌属の割合は、*Streptococcus* 属（17%）、*Fusobacterium* 属（10%）、*Prevotella* 属（8%）の順に大きくなった。*Streptococcus* 属の構成割合は、キシリトール溶液および蒸留水による洗口によって経時的に変化しなかった。*Fusobacterium* 属の構成割合は、PMTC後3日目および7日目にキシリトール溶液による洗口によってベースラインと比較して有意に減少した ( $p < 0.017$ )。さらに、PMTC後7日目の *Prevotella* 属菌の構成割合は、蒸留水による洗口よりもキシリトール溶液による洗口で有意に減少した ( $p < 0.05$ )。これらの結果は、キシリトール溶液による洗口が、PMTC後の口腔マイクロバイオームにおける *Fusobacterium* 属と *Prevotella* 属の構成割合を小さくできることを示唆している。

以上の結果より、キシリトール溶液による洗口が口腔マイクロバイオームのディスバイオーシスを防ぐ可能性が示唆された。

キーワード：キシリトール、洗口、口腔マイクロバイオーム

*Xylitol is a sweetener that shows antibacterial activity against periodontal bacteria. In this study, we investigated the effects of xylitol mouthwash on the oral microbiome after professional mechanical tooth cleaning (PMTC). After PMTC, mouthwashes containing distilled water were used once a day for 7 days, followed by mouthwashes containing xylitol once a day for 7 days, after an interval of at least 3 months. Gingival crevicular fluid was obtained from the interdental spaces of the mandibular first and second molars before (baseline) and 1, 3, and 7 days after PMTC. Next-generation sequencing was used to identify the oral microbiome of the gingival crevicular fluid. At baseline, the oral microbiome predominantly showed *Streptococcus* spp. (17%), followed by *Fusobacterium* spp. (10%), and *Prevotella* spp. (8%). The*

percentage of *Streptococcus* spp. did not change over time following the use of mouthwashes containing distilled water and xylitol. Compared with baseline values, the percentage of *Fusobacterium* spp. was significantly decreased after the use of mouthwash containing xylitol on days 3 and 7 after PMTC ( $p < 0.017$ ). Seven days after PMTC, the percentage of *Prevotella* spp. was significantly lower following the use of mouthwash containing xylitol than that observed after the use of mouthwash containing distilled water ( $p < 0.05$ ). These results suggest that mouthwashes containing xylitol can reduce the percentage of *Fusobacterium* spp. and *Prevotella* spp. after PMTC.

Key words : xylitol, mouthwash, oral microbiome

## 緒 言

キシリトールは、天然に存在する炭素数5のポリオールであり、イチゴやカリフラワー等に含まれている。キシリトールは、ミュータンスレンサ球菌による不溶性グルカン合成の基質にならず<sup>1)</sup>、また口腔内細菌による酸産生の基質にならないため齲蝕を発生させない甘味料として知られている<sup>2-4)</sup>。1974年に発表されたTurku Sugar Studyによると、スクロースの代わりにキシリトールを摂取した研究参加者は、2年間にわたって齲蝕の発生が少なくなったことが報告されている<sup>5)</sup>。

口腔内細菌の多くは、フルクトースホストランスフェラーゼ系を介してキシリトールを細胞内に輸送することができる<sup>6)</sup>。細胞内に入ると、キシリトールはリン酸化されてキシリトール-5-リン酸になり、その後細胞から排出される<sup>7)</sup>。この際使用するエネルギー消費サイクルがミュータンスレンサ球菌の増殖抑制に関与しており、このようなメカニズムによりキシリトールには齲蝕抑制効果があると考えられている<sup>7)</sup>。また、キシリトールは、ヒト唾液中細菌の $\beta$ -グルコシダーゼを阻害することにより、口腔内のバイオフィーム形成を抑制することが報告されている<sup>8)</sup>。さらに、*in vitro*の研究より、キシリトールが歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* に対しても抗菌性を示すことも明らかにされている<sup>9)</sup>。すなわち、キシリトールは、口腔内のバイオフィーム形成や歯周病原性細菌の増殖を抑える効果もあることが分かっている。

健康な歯周組織は、局所的な微生物生態系に対する免疫応答のバランスをとることにより、組織の恒常性を維持している。一方で、口腔マイクロバイームに占める歯周病原性細菌の割合の増加によるディスバイオーシスは、組織の恒常性を乱し、その結果として歯周病を発症させる<sup>10)</sup>。これまでの研究により、レッドコンプレックスやオレンジコンプレックスと称される細菌群が、歯周病原性を有することが明らかにされて

いる<sup>11)</sup>。もしキシリトールによって、口腔マイクロバイームに占める歯周病原性細菌の割合を下げる事ができれば、その効果は歯周病の特異的予防に応用できると期待される。

Professional mechanical tooth cleaning (PMTC) は、歯科医師や歯科衛生士が、専用の機器を用いて口腔内全体の歯面清掃を行うことである<sup>12)</sup>。歯肉健康者に対するPMTCは、歯周病の特異的予防となる。しかし、PMTCによって一度除去された口腔内のバイオフィームは、一定の期間をおいて再形成する<sup>13)</sup>。そのため、健康な歯周組織を長く保つためには、PMTC後の口腔マイクロバイームにおいてディスバイオーシスを防ぐためのケアを行うことが望まれる。

本研究では、スケーリングおよびPMTCを行い、その後キシリトール溶液による洗口を行うと、口腔マイクロバイームの構成に影響を与えるのではないのかという仮説を立て、キシリトール溶液洗口の効果を経時的に検討することを目的とした。また、PMTC前後の口腔マイクロバイームについて、どこから採取したサンプルをどれくらいの期間評価すればよいのかが不明であった。そこで、まずは予備調査として歯肉が健康な者の歯肉溝滲出液と唾液を用いて、PMTC前、1日後、3日後および7日後の口腔マイクロバイームの構成の変化を検討した。続いて、PMTC後の口腔マイクロバイームの構成の経時的な変化について、キシリトール溶液による洗口と蒸留水による洗口が及ぼす影響を比較検討した。

## 被験者および方法

### 1. 被験者の選定

本研究の被験者は、下記の選択基準を満たし、かつ除外基準に抵触しない者とした。

#### 選択基準

- 1) 同意取得時の年齢が20歳以上の男女
- 2) 歯周ポケットの深さが3 mm以下の者
- 3) プロービング時の出血が9%未満の者<sup>14)</sup>

## 4) 未処置の齲蝕がない者

## 除外基準

- 1) 喫煙者
- 2) 同意取得日から3か月以内または研究期間中に、抗菌薬、抗炎症薬等、試験に影響を与える可能性がある医薬品を服用した者
- 3) 同意取得日から3か月以内に歯科治療を行っていた者、または現在歯科治療中の者
- 4) 心臓、肝臓、腎臓、消化器等に重篤な疾患の既往歴および現病歴がある者
- 5) 妊娠中にある者

年齢、性別、喫煙習慣の有無は口頭で尋ねた。また、歯周ポケットの深さとプロービング時の出血の割合(%)はCommunity periodontal indexに基づき評価した<sup>15)</sup>。さらに、未処置の齲蝕の有無を視診で確認した。その結果、10名(男性6名、女性4名、平均年齢25.9歳)が被験者に選ばれた。その内7名(男性4名、女性3名、平均年齢27.3歳)は予備調査にも参加した。

実験期間中、すべての被験者は、指定した歯ブラシ(ビトイーン®レギュラー/ふつう;ライオン歯科材、東京)と歯磨剤(クリニカ®;ライオン歯科材)を用いた。口腔清掃の方法は、被験者が普段行っている方法で行った。なお、本試験のプロトコルは朝日大学歯学部倫理委員会の承認(承認番号:35004)を得ている。また、すべての被験者に対して、本研究の目的と方法について十分な説明を行った上で、研究に協力することへの同意を文書で得た。

## 2. 歯肉溝滲出液と唾液の比較

各被験者の口腔衛生状態をOral hygiene index-simplified (OHI-S)を用いて評価した<sup>16)</sup>。その後、スケーリングおよびPMTCを行った。スケーリングではエアースケーラー(エミー560®;ヨシダ、東京)を用いて、歯肉縁上の歯石除去を、スケーラーチップ(エミーチタンチップNo.3;ヨシダ)を用いて行った。PMTCではPMTC用ブラシ(メルサージュブラシスクリュタイプNo.11;松風、京都)とPMTCペースト(メルサージュファイン;松風)を用いた歯面清掃を行った。

PMTCを行った日から7日間、蒸留水による洗口を1日1回の頻度で就寝前に行った。1回あたり20 mlの蒸留水を2分間洗口した。

PMTC前と、PMTCを行ってから1日後、3日後、7日後において、歯肉溝滲出液と唾液の採取を行った。歯肉溝滲出液は、下顎第1、2大白歯歯間部歯肉縁下

に滅菌ペーパーポイントを30秒間挿入して採取した。唾液は、唾液採取用コットンを1分間口腔内に留置し唾液を染み込ませて採取した。

## 3. 蒸留水とキシリトール溶液の比較

各被験者の口腔衛生状態をOHI-Sで評価した後、スケーリングおよびPMTCを予備調査と同じ方法で行った。その後、蒸留水による洗口を、1日1回の頻度で7日間就寝前に行った。3か月以上の間隔を空けた後、再度スケーリングおよびPMTCを行い、今度はキシリトール溶液による洗口を、1日1回の頻度で7日間就寝前に行った。キシリトール溶液の濃度は10%とした<sup>6, 17)</sup>。1回あたり20 mlの蒸留水もしくは10%キシリトール溶液を2分間洗口した。

10%キシリトール溶液は、キシリトール粉末(富士フィルム和光純薬、大阪)と蒸留水を被験者に配布し、洗口の直前に被験者自身で作製した。

PMTC前と、1日後、3日後、7日後において、歯肉溝滲出液の採取を行った。歯肉溝滲出液は、予備調査と同様、下顎第1、2大白歯歯間部の歯肉溝に滅菌ペーパーポイントを30秒間挿入して採取した。

## 4. 口腔マイクロバイオームの解析

採取したサンプルから細菌のDNAを、キット(QIAamp DNA Microbiome Kit, Qiagen, Hilden, Germany)を用いて抽出した。続けて、16S rRNA遺伝子の増幅とMiSeq シークエンサー(Illumina, San Diego, CA, USA)による塩基配列の解読、並びに菌種の同定を瑞輝科学生物(久留米)に委託した。実際に行った解析の手順を以下に示す。

細菌DNA溶液1μLを鋳型とし、Forward プライマー(515 Forward: AACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT- GTGCCAGCMGCCGCGGTAA)1μL, Reverse プライマー(806 Reverse: GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-GGACTACHVGGGTWTCTAAT)1μLを含むPCR反応液20μLとの増幅反応を、Illumina社推奨の反応条件(初期熱変性を94°C, 2分, サイクリングは熱変性を94°C, 30秒, アニーリングを55°C, 30秒, 伸長反応を72°C, 30秒で8サイクル, 最終伸長反応は72°C, 5分)で行った。続けて、このPCR産物を鋳型として、V3-4領域(2 x 250 bp)を対象とした2回目のPCR反応を行った。2回目のPCR反応では、1回目のPCR反応液2μL, Forward プライマー(AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-Index2- AACTCTTTCCCTACACGACGC)1μL, Reverse プライマー(CAAGCAGAAGACGGCA

TACGAGAT-Index1- GTGACTGGAGTT CAGACGTGTG) 1 $\mu$ L を含む計 20 $\mu$ L の溶液を用いて、1 回目と同じ条件で増幅反応を行った。その後、MiSeq シークエンサーを使用して、各サンプルの塩基配列を解読した。また、16S rRNA 遺伝子データベースを事前にクラスタリング解析 (相同性 97%) し、Operational taxonomic unit としてグループ化済みの系統分類データに割り振り、細菌系統分類データを得た。

## 5. 統計解析

連続変数で得られたデータの正規性を Kolmogorov-Smirnov テストで確認した。すべてのデータは正規分布しなかったため、データは中央値 (25 パーセンタイル値, 75 パーセンタイル値) で表した。

蒸留水による洗口と、キシリトールによる洗口の比較には Wilcoxon の符号順位検定を用いた。また、各群における PMTC 前および PMTC を行ってから 1 日後, 3 日後, 7 日後の 4 時点間の各菌属の割合の多重比較には Friedman の順位検定を用いた。さらに、PMTC 前と他の時点との比較には Wilcoxon の符号順位検定 (ボンフェローニ法による補正) を用いた。有意水準は 5 % (ボンフェローニ補正では 0.017 %) とした。分析にはソフトウェア (SPSS Statistics Ver. 27, 日本 IBM, 東京) を用いた。

## 結 果

### 1. 対象者特性

被験者の対象者特性を表 1 に示す。すべての被験者は 20 歯以上の現在歯を有していた。また、プロービング時の歯肉出血箇所の割合 (BOP) は 9% 未満で、OHI-S は 1 未満だった。

### 2. 歯肉溝滲出液と唾液のマイクロバイオームの比較

PMTC 前 (ベースライン) における、歯肉溝滲出液のマイクロバイオームにおける細菌属の構成割合は、構成割合が高い細菌属から順に、*Streptococcus* 属 (17.3%), *Fusobacterium* 属 (9.7%), *Prevotella* 属 (7.9%), *Actinomyces* 属 (5.5%), *Porphyromonas* 属 (4.4%), *Campylobacter* 属 (2.8%) であった。一方、ベースラインにおける、唾液のマイクロバイオームにおける細菌属の構成割合は、構成割合が高い細菌属から順に *Streptococcus* 属 (32.5%), *Neisseria* 属 (13.6%), *Prevotella* 属 (10.6%), *Porphyromonas* 属 (5.6%), *Gemella* 属 (5.5%), *Haemophilus* 属 (4.9%) であった。

また、主な細菌属の構成割合の経時的变化について、歯肉溝滲出液のマイクロバイオームでは、*Fusobacterium* 属と *Prevotella* 属と *Campylobacter* 属は、ベースラインと比較し 1 日後および 3 日後に減少し 7 日後に元の割合に戻っていく傾向が観察された。また、*Haemophilus* 属は、ベースラインと比較し 1 日後以降に構成割合が増加している傾向があった。一方、唾液のマイクロバイオームにおいては、すべての細菌属において構成割合の著明な増減は観察されなかった (図 1)。

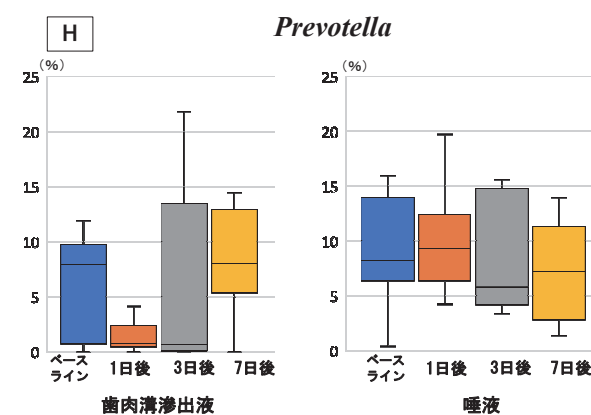
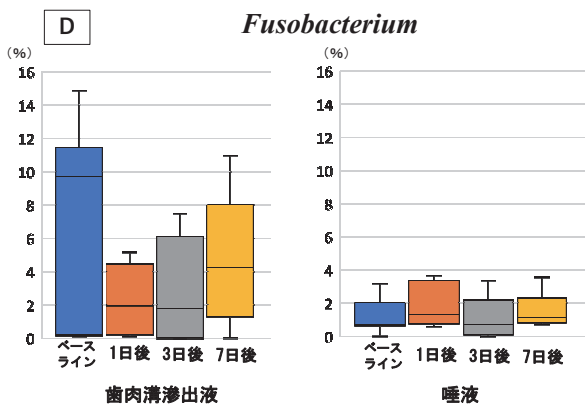
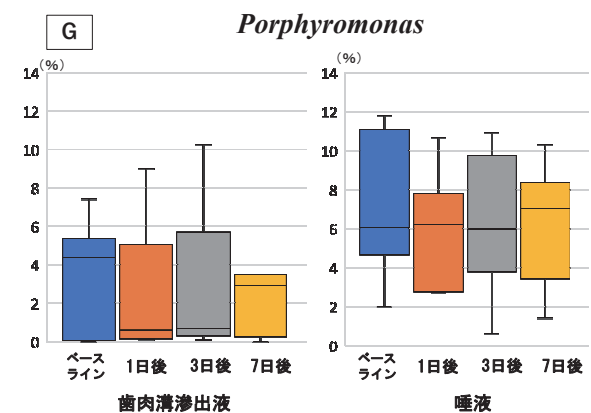
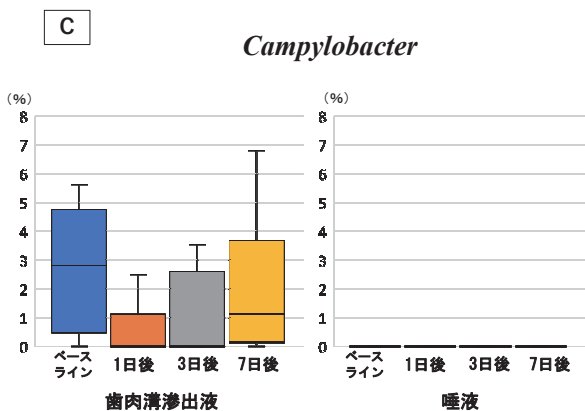
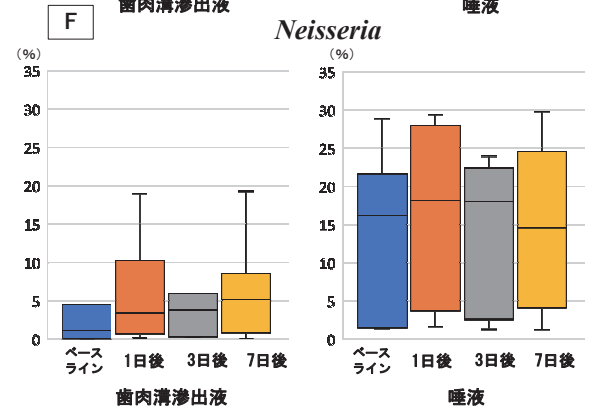
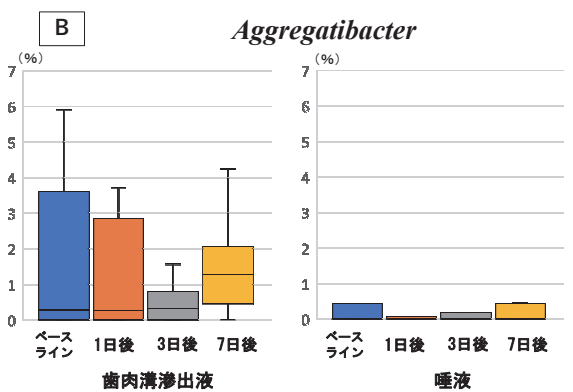
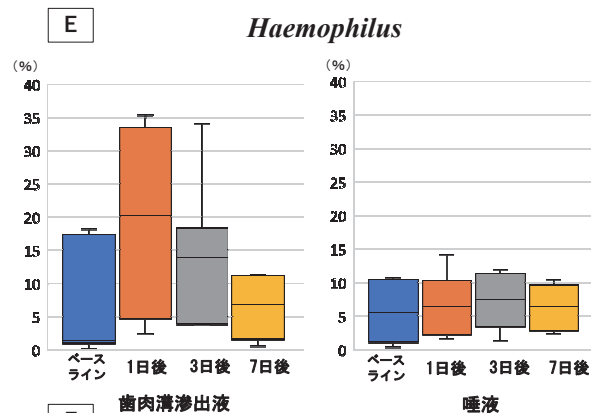
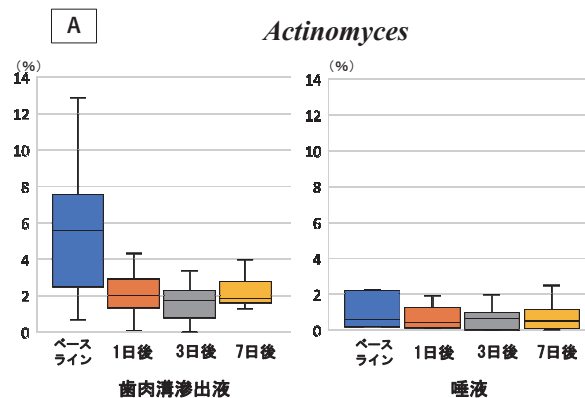
### 3. 蒸留水とキシリトール溶液による洗口の比較

予備調査において、歯肉溝滲出液および唾液におけるマイクロバイオームの細菌属の構成割合は異なっており、構成割合の経時的变化の傾向も異なっていた。構成割合の経時的变化が比較的明瞭に観察された歯肉溝滲出液のマイクロバイオームを本実験における調査対象とした。ベースライン, 1 日後, 3 日後, 7 日後における、蒸留水による洗口を行った群 (蒸留水群) と 10 % キシリトール溶液による洗口を行った群 (キシリトール群) の群間比較を行ったとこ

表 1 対象者特性 (中央値 [25 パーセンタイル値, 75 パーセンタイル値])

| 歯肉溝滲出液と唾液の比較 (n=7)     |                  |             |               |
|------------------------|------------------|-------------|---------------|
| 年齢(歳)                  | 現在歯数(本)          | BOP(%)      | OHI-S         |
| 25.0(24.0, 30.5)       | 28.0(28.0, 28.0) | 0.0(0, 3.3) | 0.4(0.3, 0.5) |
| 蒸留水群とキシリトール群の比較 (n=10) |                  |             |               |
| 年齢(歳)                  | 現在歯数(本)          | BOP(%)      | OHI-S         |
| 24.5(23.0, 27.3)       | 28.0(28.0, 28.0) | 0.0(0, 5.9) | 0.3(0.3, 0.6) |





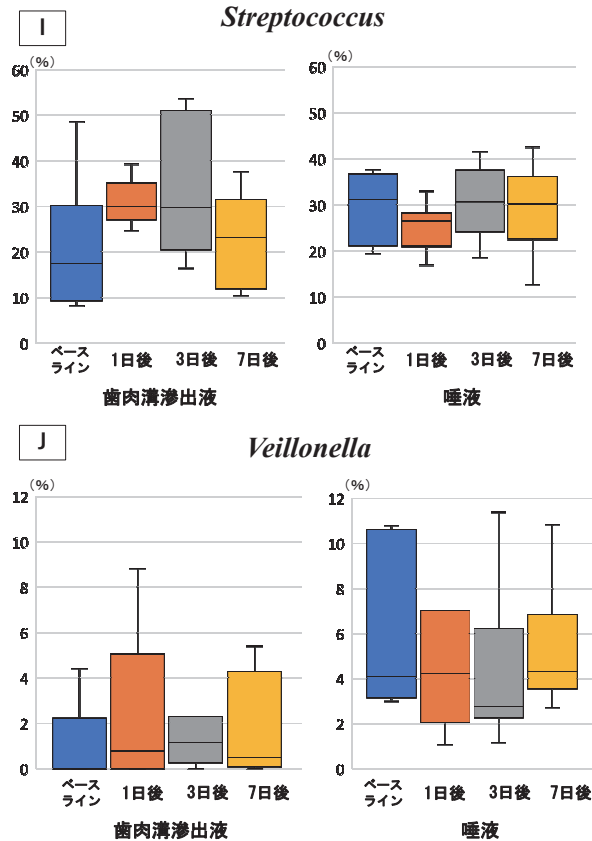


図1 歯肉溝滲出液と唾液における主な細菌属の構成割合の経時的变化の比較 (n=7)

- A ; *Actinomyces* 属
- B ; *Aggregatibacter* 属
- C ; *Campylobacter* 属
- D ; *Fusobacterium* 属
- E ; *Haemophilus* 属
- F ; *Neisseria* 属
- G ; *Porphyromonas* 属
- H ; *Prevotella* 属
- I ; *Streptococcus* 属
- J ; *Veillonella* 属

ろ, *Prevotella* 属は, 7日後において, キシリトール群が蒸留水群と比較し有意に構成割合が減少していた ( $p < 0.05$ ) (表2).

次に, ベースラインに対する, 1日後, 3日後および7日後の群間比較を, 蒸留水群およびキシリトール群それぞれについて行った (図2). *Actinomyces* 属は, 蒸留水群で, ベースラインに対して3日後および7日後に有意に構成割合が減少した ( $p < 0.017$ ). *Campylobacter* 属は, 蒸留水群で, ベースラインに対して3日後および7日後に有意に構成割合が減少した ( $p < 0.017$ ). *Fusobacterium* 属は, キシリトール群で,

ベースラインに対して3日後および7日後に有意に構成割合が減少していた ( $p < 0.017$ ). *Haemophilus* 属は, キシリトール群で, ベースラインに対して1日後および3日後に有意に構成割合が増加し, 蒸留水群で, ベースラインに対して3日後に有意に構成割合が増加した ( $p < 0.017$ ). *Veillonella* 属は, キシリトール群で, ベースラインに対して7日後に有意に構成割合が増加した ( $p < 0.017$ ).

## 考 察

本研究では, PMTC後に10%キシリトール溶液を

用いた洗口を行うことで、口腔マイクロバイオームがどのように変化するかを検討した。予備調査では、歯肉溝滲出液と唾液を比較した。その結果、歯肉溝滲出液のマイクロバイオームはPMTCによる経時的な変化を示したのに対し、唾液のマイクロバイオームは経時的な変化が著明でなかった。そこで、本研究では歯肉溝滲出液のマイクロバイオームを対象を絞って検討することにした。本研究では、キシリトール群で、ベースラインに対して3日後および7日後

に有意に *Fusobacterium* 属の構成割合が減少していた。すなわち、本研究の結果は、キシリトール溶液による洗口がPMTC後の口腔マイクロバイオームの構成において、*Fusobacterium* 属の構成割合を低下させることを示している。*Fusobacterium* 属は、強力な接着因子を有しており様々な口腔内細菌を物理的にまとめる役割を担っている<sup>13)</sup>。なかでも、*Fusobacterium nucleatum* は他の常在菌とのアミノ酸を介した相互作用によりポリアミンを産生し、そのポリアミンがP.

表2 歯肉溝滲出液のマイクロバイオームにおける細菌属の構成割合の比較  
[n = 10, 中央値 (25パーセンタイル値, 75パーセンタイル値)]

| 細菌属                    | 蒸留水群             | キシリトール群          | p-value <sup>a</sup> |
|------------------------|------------------|------------------|----------------------|
| <i>Actinomyces</i>     |                  |                  |                      |
| ベースライン                 | 2.7 (0.3, 6.3)   | 3.0 (1.6, 6.2)   | 0.598                |
| 1日後                    | 1.5 (0.3, 2.4)   | 1.3 (0.6, 2.6)   | 0.721                |
| 3日後                    | 1.3 (0.7, 1.9)   | 1.6 (0.4, 2.4)   | 0.646                |
| 7日後                    | 1.8 (1.5, 2.9)   | 3.6 (1.0, 6.6)   | 0.241                |
| <i>Aggregatibacter</i> |                  |                  |                      |
| ベースライン                 | 1.0 (0.5, 2.3)   | 0.5 (0.0, 4.8)   | 0.433                |
| 1日後                    | 0.6 (0.0, 3.0)   | 0.8 (0.2, 2.8)   | 0.878                |
| 3日後                    | 0.3 (0.0, 1.2)   | 0.4 (0.0, 4.6)   | 0.11                 |
| 7日後                    | 1.5 (0.3, 2.6)   | 0.3 (0.1, 1.4)   | 0.333                |
| <i>Campylobacter</i>   |                  |                  |                      |
| ベースライン                 | 3.2 (0.4, 3.9)   | 2.5 (0.4, 3.8)   | 0.833                |
| 1日後                    | 0.4 (0.0, 1.7)   | 1.2 (0.4, 1.9)   | 0.285                |
| 3日後                    | 0.2 (0.0, 2.8)   | 0.5 (0.0, 1.5)   | 0.889                |
| 7日後                    | 1.7 (0.7, 6.5)   | 0.4 (0.0, 2.2)   | 0.203                |
| <i>Fusobacterium</i>   |                  |                  |                      |
| ベースライン                 | 8.7 (2.0, 13.3)  | 5.7 (0.3, 10.3)  | 0.27                 |
| 1日後                    | 2.3 (0.2, 5.1)   | 2.5 (1.8, 6.6)   | 0.386                |
| 3日後                    | 2.8 (0.8, 6.4)   | 2.6 (1.2, 4.7)   | 0.575                |
| 7日後                    | 4.9 (2.5, 8.2)   | 4.2 (0.8, 8.9)   | 0.878                |
| <i>Haemophilus</i>     |                  |                  |                      |
| ベースライン                 | 0.7 (0.0, 10.3)  | 0.9 (0.3, 8.9)   | 0.964                |
| 1日後                    | 14.0 (2.8, 29.7) | 9.7 (5.3, 15.7)  | 0.445                |
| 3日後                    | 9.9 (4.3, 16.9)  | 14.1 (3.1, 22.6) | 0.721                |
| 7日後                    | 4.9 (1.3, 8.2)   | 8.2 (1.0, 23.6)  | 0.11                 |



|                      |                   |                   |       |
|----------------------|-------------------|-------------------|-------|
| <i>Neisseria</i>     |                   |                   |       |
| ベースライン               | 2.1 (0.0, 4.4)    | 2.0 (0.3, 6.0)    | 0.992 |
| 1 日後                 | 4.3 (0.6, 11.2)   | 4.8 (2.2, 9.1)    | 0.386 |
| 3 日後                 | 4.6 (0.6, 9.2)    | 6.3 (3.0, 10.5)   | 0.386 |
| 7 日後                 | 4.7 (0.7, 11.2)   | 2.5 (2.0, 4.6)    | 0.203 |
| <i>Porphyromonas</i> |                   |                   |       |
| ベースライン               | 0.9 (0.1, 3.0)    | 4.3 (0.1, 5.8)    | 0.149 |
| 1 日後                 | 1.0 (0.2, 1.6)    | 0.9 (0.3, 6.0)    | 0.203 |
| 3 日後                 | 0.7 (0.3, 2.3)    | 1.7 (0.4, 8.3)    | 0.114 |
| 7 日後                 | 0.8 (0.1, 4.5)    | 3.0 (2.1, 7.2)    | 0.508 |
| <i>Prevotella</i>    |                   |                   |       |
| ベースライン               | 6.3 (0.5, 8.1)    | 7.0 (1.4, 10.3)   | 0.611 |
| 1 日後                 | 1.6 (0.6, 4.7)    | 3.7 (2.5, 6.4)    | 0.241 |
| 3 日後                 | 4.4 (0.2, 9.5)    | 1.9 (0.5, 5.2)    | 0.386 |
| 7 日後                 | 6.9 (4.3, 10.4)   | 2.3 (0.4, 7.8)    | 0.047 |
| <i>Streptococcus</i> |                   |                   |       |
| ベースライン               | 16.0 (8.0, 32.5)  | 18.8 (12.5, 34.8) | 0.391 |
| 1 日後                 | 30.9 (26.5, 37.4) | 27.2 (22.8, 41.6) | 0.799 |
| 3 日後                 | 22.9 (17.6, 46.4) | 29.6 (20.0, 35.0) | 0.959 |
| 7 日後                 | 21.1 (13.3, 30.0) | 31.3 (12.9, 36.5) | 0.285 |
| <i>Veillonella</i>   |                   |                   |       |
| ベースライン               | 0.5 (0.0, 2.2)    | 0.4 (0.0, 2.4)    | 0.926 |
| 1 日後                 | 0.5 (0.0, 3.3)    | 0.4 (0.1, 4.8)    | 0.594 |
| 3 日後                 | 1.4 (0.2, 3.0)    | 0.5 (0.3, 2.5)    | 0.646 |
| 7 日後                 | 1.8 (0.2, 3.2)    | 2.8 (0.9, 5.0)    | 0.285 |

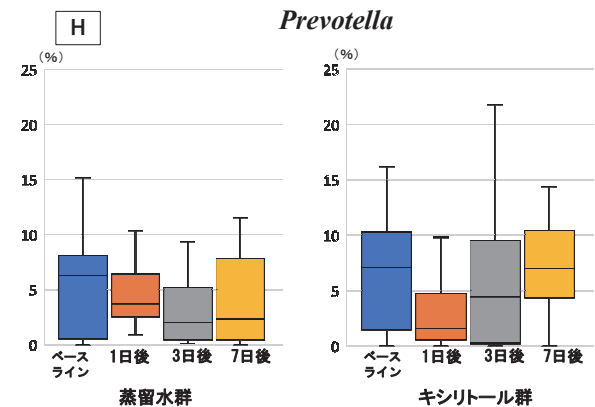
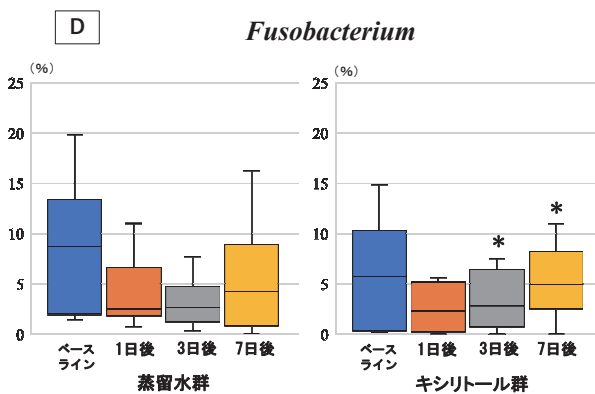
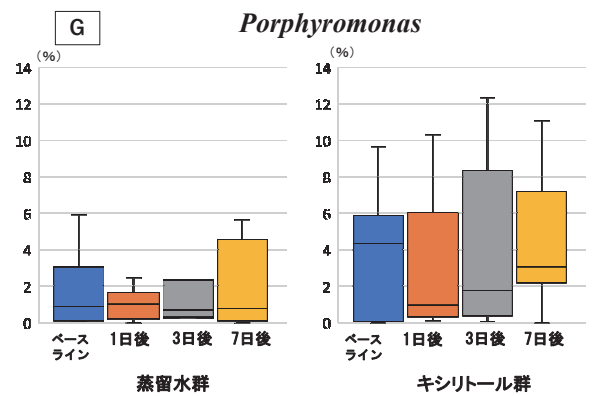
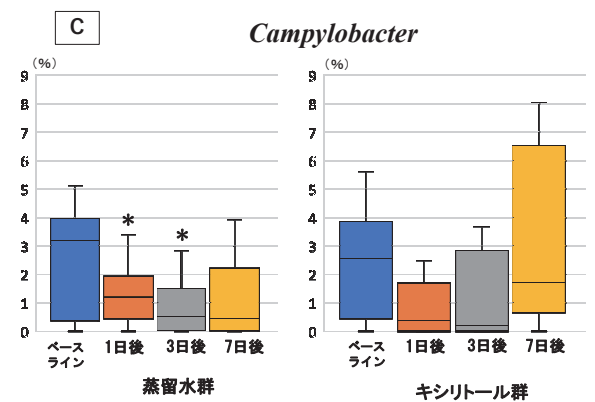
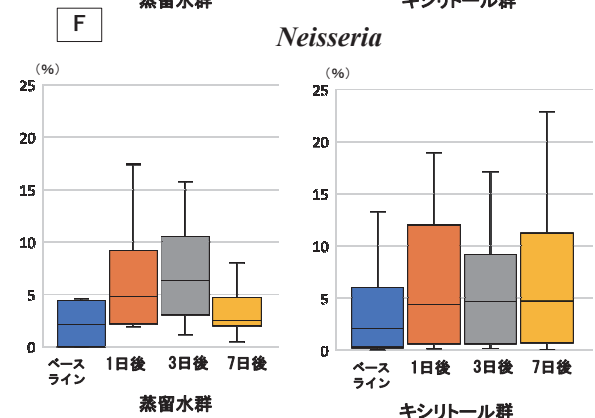
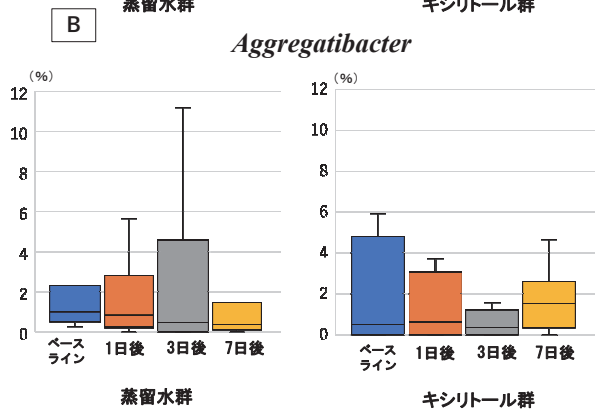
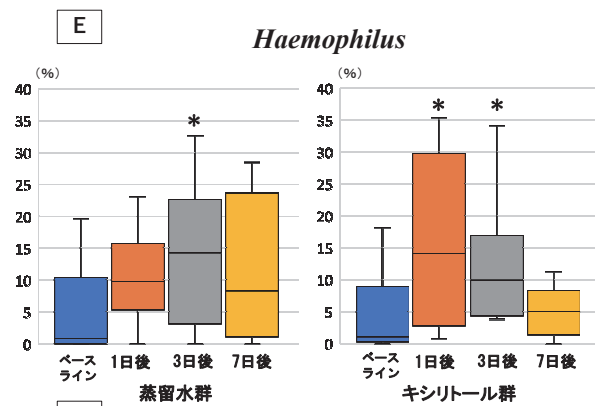
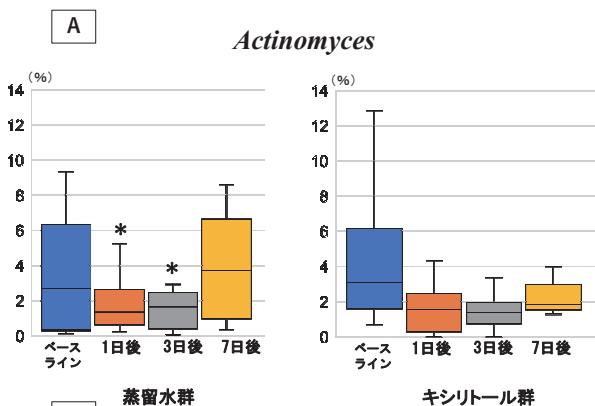
<sup>a</sup>Wilcoxon の符号付き順位検定

*gingivalis* を活性化してディスバイオーシスを促すというメカニズムが報告されている<sup>18)</sup>。したがって、キシリトール溶液による洗口は、PMTC後の口腔マイクロバイオームのディスバイオーシスを防ぐことができる可能性がある。

PMTC後の経時的变化について、本研究では、1日後および3日後の*Haemophilus*属の構成割合は、キシリトール洗口によってベースライン時の値よりも有意に増加していた。また、蒸留水による洗口でも3日後の*Haemophilus*属の構成割合はベースライン時の値よりも有意に増加していた。これは、スクレーリングおよびPMTCを行うことで

*Haemophilus*属の構成割合が増加したことを示唆している。さらにキシリトール溶液を用いた洗口では、*Haemophilus*属の構成割合が増加している期間が、蒸留水を用いた洗口よりも長いことが示された。*Haemophilus*属は、バイオフィーム形成において、早期定着細菌に分類される<sup>13)</sup>。本研究における早期定着菌の構成割合の増加は、キシリトール溶液を用いた洗口の方が、より長く後期定着細菌の定着を阻害した結果を反映しているかもしれない。

*Haemophilus*属の*Haemophilus parainfluenzae*は、*P. gingivalis*の付着を阻害する効果を有することが報告されている<sup>19)</sup>。キシリトール溶液を用いた洗口



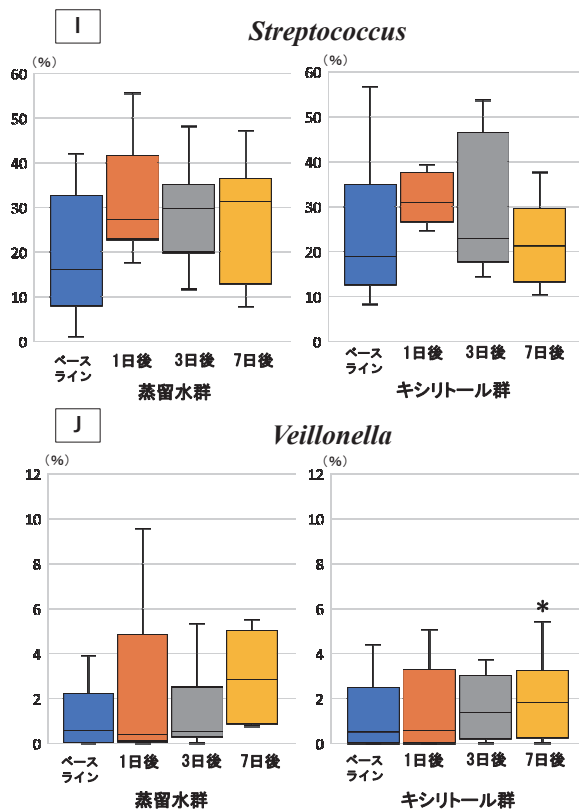


図2 蒸留水群とキシリトール群それぞれにおける主な細菌属の構成割合の経時的変化の比較 (n=10)

\*  $p < 0.017$ , Wilcoxon の符号付き順位検定 (ボンフェローニ法による補正)

- A: *Actinomyces* 属
- B: *Aggregatibacter* 属
- C: *Campylobacter* 属
- D: *Fusobacterium* 属
- E: *Haemophilus* 属
- F: *Neisseria* 属
- G: *Porphyromonas* 属
- H: *Prevotella* 属
- I: *Streptococcus* 属
- J: *Veillonella* 属

は、*Haemophilus* 属の構成割合を高めることによって、口腔マイクロバイオーム中の歯周病原菌である *P. gingivalis* の付着を阻害していると推測される。

口腔マイクロバイオーム中の *Veillonella* 属の構成割合は、キシリトール溶液の洗口によってベースラインに対して7日後に有意に増加した。*Veillonella* 属は健康な人の口腔内にも多く存在する口腔常在菌である<sup>20)</sup>。また、*Veillonella* 属は硝酸塩から亜硝酸を産生する能力があることが報告されており<sup>21)</sup>、亜硝酸に

*P. gingivalis* や *S. mutans* の増殖や活性を抑える効果があることも分かっている<sup>22)</sup>。したがって、キシリトール溶液を用いた洗口による *Veillonella* 属の構成割合の増加は、*P. gingivalis* や *S. mutans* をリスク要因とする口腔疾患の予防につながると考えられる。

さらに、*Prevotella* 属は、7日後において、キシリトール群での構成割合が、蒸留水群の構成割合と比較して有意に小さかった。*Prevotella* 属の *Prevotella intermedia* は、炎症性サイトカインやマトリックス

メタロプロテアーゼの放出を刺激することにより、歯周病の進行を促進する<sup>23)</sup>。キシリトール溶液の洗口は、*Prevotella* 属の構成割合を減らすことによって、歯周病の進行を遅らせる効果もあるのかもしれない。

また、口腔マイクロバイオーム中の *Actinomyces* 属および *Campylobacter* 属の構成割合は、蒸留水での洗口によってベースラインに対して1日後および3日後に有意に減少した。これは、スクレーピングおよび PMTC を行うことでこれらの細菌属の構成割合が低下することを示している。一方、キシリトール溶液を用いた洗口では、これらの細菌属の構成割合が有意に低下しなかった。この理由は不明であるため、今後さらなる検討が必要である。

本研究では、PMTC 後の唾液中のマイクロバイオームの構成に大きな変動はなかった。この結果は、歯周治療前後の唾液中のマイクロバイオームがほとんど変動しなかった過去の研究結果と一致する<sup>24)</sup>。本研究のような歯科介入による口腔マイクロバイオームの変動の観察を目的とした実験では、唾液中のマイクロバイオームは検体として適していないと考えられる。

これまでのキシリトールの歯周病原細菌に対する報告は、*in vitro* 研究がほとんどである。臨床研究も何例か報告されているが、その多くがキシリトール配合ガムを用いた研究であり<sup>2, 6, 25)</sup>、キシリトール含有洗口液を用いてキシリトールの口腔マイクロバイオームへの影響を検討する臨床研究は本研究が初めてである。しかし、ガムや洗口液を含めて、どのような方法がキシリトールの効果をより発揮できるのかははまだ不明である。また、本研究でのキシリトール溶液を用いた洗口は、10%キシリトール溶液が *P. gingivalis* や *F. nucleatum* の増殖を抑制したという研究報告を参考にした<sup>6, 17)</sup>。しかしながら、20%キシリトールで *P. gingivalis* の増殖抑制が認められたという報告もある<sup>9)</sup>。今後は様々な方法、濃度を変えてキシリトールの効果を比較検討する必要があると考える。また、キシリトールは多量に摂取すると消化器症状を引き起こす可能性があるため比較的副作用が少ないエリスリトールなどの他の糖アルコールを用いて同様の研究を行う余地もある。

本研究の限界の1つは、症例数が少ないことである。本研究では、次世代シーケンサーを用いてキシリトール溶液を用いた洗口の、口腔マイクロバイオームへの影響を検討した過去の研究がなかったため、必要症例数を計算することができなかった。そこで、実現可能な症例数として、10名を対象とした。しかし、症例数を増やして更なる検討を継続していく必要がある。また、今回は歯肉健康者を対象に、キシリトール溶液

による洗口が口腔マイクロバイオームにどのような影響を及ぼすかを検討した。今後は、歯周病を有する者を対象に、同様の研究を行うことが望まれる。

## 結 論

本研究では、機械的歯面清掃後にキシリトール溶液での洗口を行うことによる口腔マイクロバイオームへの影響を検討し、以下の結論を得た。

- 1) *Prevotella* 属は、7日後において、キシリトール群が蒸留水群と比較し有意に構成割合が減少した。
- 2) *Fusobacterium* 属は、キシリトール群で、ベースラインに対して3日後および7日後に有意に構成割合が減少した。
- 3) *Haemophilus* 属は、キシリトール群で、ベースラインに対して1日後および3日後に有意に構成割合が有意に増加した。
- 4) *Veillonella* 属は、キシリトール群で、ベースラインに対して7日後に有意に構成割合が増加した。

以上の結果より、キシリトール溶液による洗口が口腔マイクロバイオームのディスバイオーシスを防ぐ可能性が示唆された。

## 引用文献

- 1) Ur-Rehman S, Mushtaq Z, Zahoor T, Jamil A and Murtaza MA. Xylitol: a review on bioproduction, application, health benefits, and related safety issues. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015; 55: 1514-1528.
- 2) Soderling E, Hirvonen A, Karjalainen S, Fontana M, Catt D and Seppa L. The effect of xylitol on the composition of the oral flora: a pilot study. *Eur J Dent*. 2011; 5: 24-31.
- 3) Dodds MW. The oral health benefits of chewing gum. *J Ir Dent Assoc*. 2012; 58: 253-261.
- 4) Ritter AV, Bader JD, Leo MC, Preisser JS, Shugars DA, Vollmer WM, Amaechi BT and Holland JC. Tooth-surface-specific effects of xylitol: randomized trial results. *J Dent Res*. 2013; 92: 512-517.
- 5) Scheinin A, Mäkinen K and Ylitalo K. Turku sugar studies. An intermediate report on the effect of sucrose, fructose and xylitol diets on the caries incidence in man. *Acta Odontol Scand*. 1974; 32: 383-412.
- 6) Na HS, Kim SM, Kim S, Choi YH and Chung J. Effect of xylitol on various oral bacteria. *Int J Oral Biol*. 2013; 38: 175-180.
- 7) Nayak PA, Nayak UA and Khandelwal V. The effect of xylitol on dental caries and oral flora. *Clin, Cosmet Investig Dent*. 2014; 6: 89-94.
- 8) Teixeira Essenfelder L, Gomes AA, Miquelutti D, da

- Silva GF and Magalhães MLB. Effect of xylitol on salivary  $\beta$ -glucosidase in humans. *Eur J Oral Sci.* 2019; 127: 472-475.
- 9) 佐藤郁, 三上正人, 元井志保, 今井あかね. 齲蝕病原菌および歯周病原菌の生育に対する糖アルコールの影響について. *日本口腔保健学雑誌.* 2020 ; 10 : 25-33.
  - 10) George H. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15: 30-44.
  - 11) Socransky SS and Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005; 38: 135-187.
  - 12) Axelsson P and Odont D. Concept and practice of plaque-control. *Pediatr Dent.* 1981; 3: 101-113.
  - 13) Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS and Palmer RJJ. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002; 66: 486-505.
  - 14) 特定非営利活動法人 日本歯周病学会編. 歯周治療のガイドライン 2022 第1版. 医歯薬出版. 2022 : 82.
  - 15) WHO. Oral Health Surveys Basic Methods. 4th ed. *World Health Organization.* 1997: 36-37.
  - 16) Greene JG and Vermillion JR. The simplified oral hygiene index. *J Am Dent Assoc.* 1964; 68: 7-13.
  - 17) Krupa NC, Thippeswamy HM and Chandrashekar BR. Antimicrobial efficacy of Xylitol, Probiotic and Chlorhexidine mouth rinses among children and elderly population at high risk for dental caries - A randomized controlled trial. *J Prev Med Hyg.* 2022; 63: e282-e287.
  - 18) Sakanaka A, Kuboniwa M, Shimma S, Samar AA, Mayumi S, Richard JL, Fukusaki E and Amano A. *Fusobacterium nucleatum* metabolically integrates commensals and pathogens in oral biofilms. *mSystems.* 2022; 7: e00170-22.
  - 19) Dasith P, Anthony M, Viviana ML, Kaileigh CL, Eric A, Kiana C, Jessica MW and Matthew R. Mechanisms underlying interactions between two abundant oral commensal bacteria. *The ISME Journal.* 2022; 16: 948-957.
  - 20) Mashima I and Nakazawa F. The influence of oral *Veillonella* species on biofilms formed by Streptococcus species. *Anaerobe.* 2014; 28: 54-61.
  - 21) Dimas PW, Washio J, Abiko Y, Domon H and Takahashi N. Nitrite production from nitrate and Its link with lactate metabolism in oral veillonella spp. *Appl Environ Microbiol.* 2020; 86: e01255-20.
  - 22) Allaker RP, Silva-Mendez LS, Hardie JM and Benjamin N. Antimicrobial effect of acidified nitrite on periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2001; 16: 253-256.
  - 23) Guan SM, Shu L, Fu SM, Liu B, Xu XL, Wu JZ. *Prevotella intermedia* upregulates MMP-1 and MMP-8 expression in human periodontal ligament cells. *FEMS Microbiol Letters.* 2009; 299: 214-222.
  - 24) Yamanaka W, Takeshita T, Shibata Y, Matsuo K, Eshima N, Yokoyama T and Yamashita Y. Compositional stability of a salivary bacterial population against supragingival microbiota shift following periodontal therapy. *PLoS One.* 2012; 7: e42806.
  - 25) Wu YF, Salamanca E, Chen IW, Su JN, Chen YC, Wang SY, Sun YS, Teng NC and Chang WJ. Xylitol-containing chewing gum reduces cariogenic and periodontopathic bacteria in dental plaque-microbiome investigation. *Front Nutr.* 2022; 9: 882636.
-