

新規 Zn 置換 Hydrotalcite の歯周病関連菌  
産生 H<sub>2</sub>S の吸着効果と抗菌作用

もりた ゆうき

森田 侑宜

本論文の要旨は，第186回朝日大学大学院歯学研究科発表会（2016年10月5日，岐阜）において発表した．  
本論文の一部は，第62回日本歯科医学会・国際歯科学研究学会日本部会（JADR）学術大会（2014年12月5日，大阪），第144回日本歯科保存学会（2016年6月10日，栃木）において発表した．

## 緒 言

近年，人とのコミュニケーションが避けられない社会生活において，口臭に対する関心が深まってきており，口臭を主訴として歯科を受診する患者は年々増加傾向にある．各種口臭消臭剤がドラッグストアやマーケットで市販されており<sup>1)</sup>，口臭で悩んでいる人は潜在的に多いと思われる．中には心身症ではないかと疑われるほど深刻に考えている患者も少なくない．口臭には歯周疾患，齲蝕などの口腔内の原因が考えられるが，生理的口臭と位置づけられているもの，全身疾患などの口腔外由来とされるものに分けられ，専門家の対応が望まれている<sup>2,3)</sup>．そのうち，口臭のほとんどは口腔内の気体由来であり<sup>4)</sup>，その主要原因物質は Volatile Sulfur Compounds (VSC) である硫化水素 [H<sub>2</sub>S]，メチルメルカプタン [CH<sub>3</sub>SH]，ジメチルサルファイド [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S] と言われている<sup>5)</sup>．その中でも H<sub>2</sub>S と CH<sub>3</sub>SH で約 90% を占めている<sup>6)</sup>．VSC は臭いを感じる濃度の閾値は低く，不快感が高いために口臭の指標とされている<sup>7)</sup>．これら VSC は口腔内に生息している嫌気性菌が唾液，血液，剥離上皮細胞，食物残渣中の含硫アミノ酸（システインやメチオニン）を分解することで産生される<sup>8-11)</sup>．

産生部位としては，歯周病の病巣や舌苔があげられ，この両者では，舌苔からの VSC 産生量の方が多と言

われている<sup>12,13)</sup>。舌苔からは  $H_2S$  の産生が多いが、歯周病患者からは高い濃度の  $CH_3SH$  が検出されるとの報告もある<sup>10)</sup>。 $CH_3SH$  および  $H_2S$  を多量に産生すると考えられるものとして *Fusobacterium*, *Veillonella* 等が挙げられており<sup>14-17)</sup>、VSC 産生量の減少による口腔内の環境変化により、修復材の変色や口臭を減少、抑制する可能性があると考えている。

したがって、口腔内の VSC を効果的に除去できる材料としてミクロ孔セラミックスの層状複水酸化物である Hydrotalcite (HDT) に注目した。過去に藤井ら<sup>18)</sup>が金銀パラジウム合金の変色を防止する効果が HDT に有するかどうかを検討し、偏性嫌気性菌の歯周病関連菌である *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* により産生された VSC に対して HDT は吸着効果を示し、金銀パラジウム合金の変色を抑制することを明らかにした。

そこで、本研究ではより VSC に対する吸着能の優れた素材の開発に取り組み、 $500^{\circ}C$  で熱処理した HDT と HDT のカチオンの Mg を同じ二価のイオンとして Zn に置換した HDT を合成し、その吸着能の検討を行った。すなわち、偏性嫌気性菌の歯周病関連菌を用い、供試菌培養下における各種 HDT を混入した場合の  $H_2S$  濃度をガスクロマトグラフで測定し、 $H_2S$  産生量を抑制する効果を検討した。また、供試菌の増殖度と HDT との関係（抗菌作用）も検討し、口臭抑制材料として臨床

応用が可能な材料であるかどうか評価した。

## 材料および方法

### 1. 供試材料

#### 1) HDT の合成

$[Mg_{1-x}Al_x(OH)_2][A^{n-}_{x/n} \cdot mH_2O]$  ( $A^{n-} : CO_3^{2-}$ ,  $x=0.33$ ),  $[Zn_{1-x}Al_x(OH)_2][A^{n-}_{x/n} \cdot mH_2O]$  ( $A^{n-} : CO_3^{2-}$ ,  $x=0.33$ ) を共沈法により以下の手順で合成した. 水道水直結型超純水製造装置 (Direct-Q, Merck Milli Pore, Darmstadt, Germany) より採取した超純水 (MilliQ 水) 300 mL に炭酸ナトリウム ( $Na_2CO_3$ , 和光純薬工業, 大阪) を溶解した炭酸ナトリウム溶液を, MilliQ 水 100 mL に水酸化ナトリウム ( $NaOH$ , 和光純薬工業, 大阪) を溶解した水酸化ナトリウム溶液を, さらに MilliQ 水 100 mL に MgHDT 合成には硝酸マグネシウム六水和物 ( $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ , 和光純薬工業, 大阪), ZnHDT 合成には硝酸亜鉛六水和物 ( $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ , 関西触媒化学, 堺) を用い, 硝酸アルミニウム九水和物 ( $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ , 和光純薬工業, 大阪) を溶解した硝酸塩溶液をそれぞれ調製した. 炭酸ナトリウム溶液を攪拌しながら硝酸塩溶液を加え, さらに水酸化ナトリウム溶液を添加し, 溶液の pH が 10.0 になるよう調整した. 混合溶液を室温で 24 時間攪拌して熟成させた. 得られた生成物を吸引ろ過にてろ別し, 得られた生成物を 80 °C で 12 時間乾燥した. 乾燥処理後, めのう乳鉢で解砕し, 得られた試料をそれぞれ MgHDT 試

料， ZnHDT 試料とした（表 1）。

また， MgHDT 試料を電気炉で， 処理温度 500 °C ， 保持時間 30 分で熱処理し， 得られた試料を MgHDT500 とした（図 1）。

表 1 試薬の使用量

sample	Mg/Al,Zn/Al比	Reactants[moles]				
		Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	NaOH
MgHDT試料	2	0.02	0	0.01	0.047	0.05
ZnHDT試料	2	0	0.02	0.01	0.047	0.05

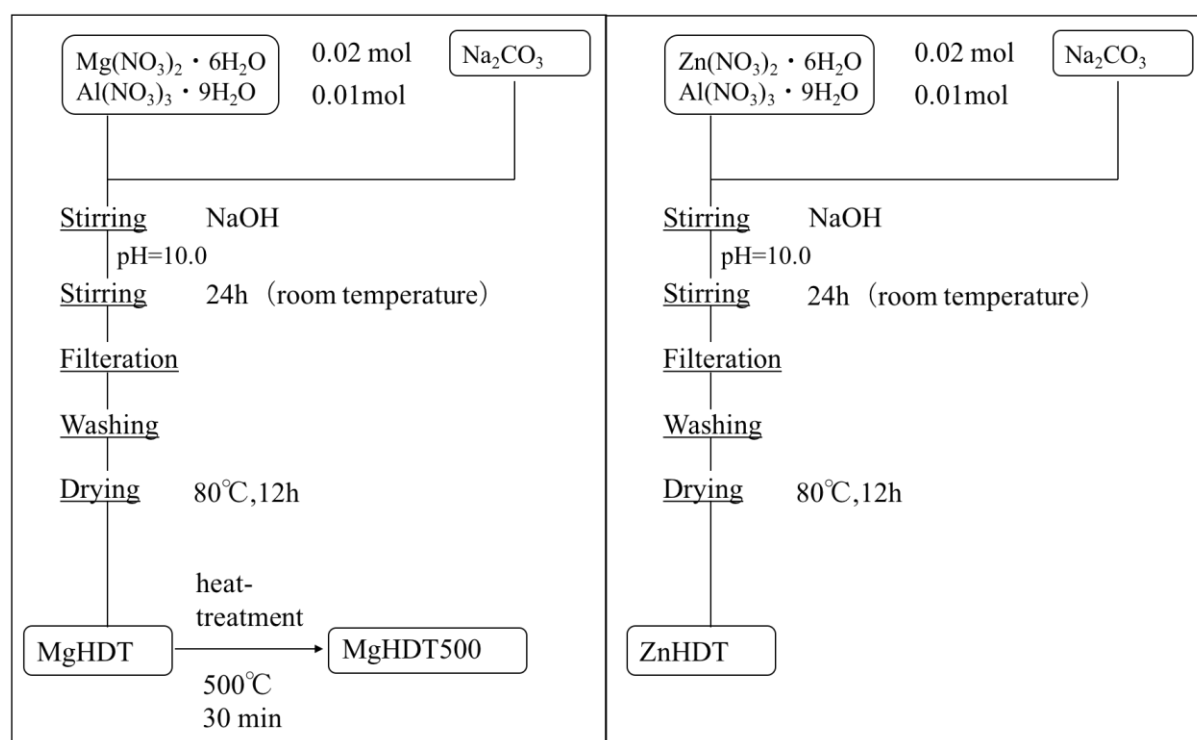


図 1 HDT の合成方法

## 2) HDT 合成物の評価

合成物の評価方法として粉末の X 線回折 (XRD) を X 線回折装置 (RINT2200, Rigaku, 東京) で測定し，

典型的な HDT の回折線図と比較した。また、フーリエ変換赤外分光装置 (FT/IR-430, JASCO, 東京) と分析ソフト (Spectra Manager, JASCO, 東京) にてスペクトル解析を行った。さらに、電界放射型走査型電子顕微鏡 (FE-SEM, JSM-6500F, JEOL, 東京) で観察し、エネルギー分散型 X 線分析装置 (EDS, JSM-6500F, JEOL, 東京) を用いて同一試料の 5 ヶ所について組成分析した。

## 2. H<sub>2</sub>S 濃度の測定

### 1) 標準物質の測定と検量線の作成

H<sub>2</sub>S は標準物質 (N<sub>2</sub> バランス, ボンベ入り, 太陽日酸, 東京) を用いて気体を真空のテトラバックに捕集して N<sub>2</sub> で希釈し、濃度を 1000, 500, 200, 100, 50, 20, 10ppm となるように調整した。その後、各濃度の H<sub>2</sub>S ガスをガスタイトシリンジ (1005LTN PT#5, Hamilton, Reno, NV, USA) にて 3 mL 採取し、ガスクロマトグラフ (GCMS QP5050A, 島津製作所, 京都) に注入した。H<sub>2</sub>S は 3.358 秒の保持時間にピークが現れた。図 2 に H<sub>2</sub>S 標準物質の 1000ppm におけるガスクロマトグラフを示す。ガスクロマトグラフの分析条件は分離カラムが 60~80 メッシュの 20% Dinonyl Phthalate 含有テフロンカラム (Rtx-Q-BOND, 島津ジーエルシー, 京都) で内径 0.32, 長さ 30mm, 使用条件は気化室温度 120℃, インターフェース温度 230℃, キャリアガスは He ガス (供給圧力 700~800kPa, 純度



99.5%) である。各濃度の標準物質について同じ操作を3回繰り返して、得られたピーク面積から検量線を作成し、定量分析を行った(図3)。

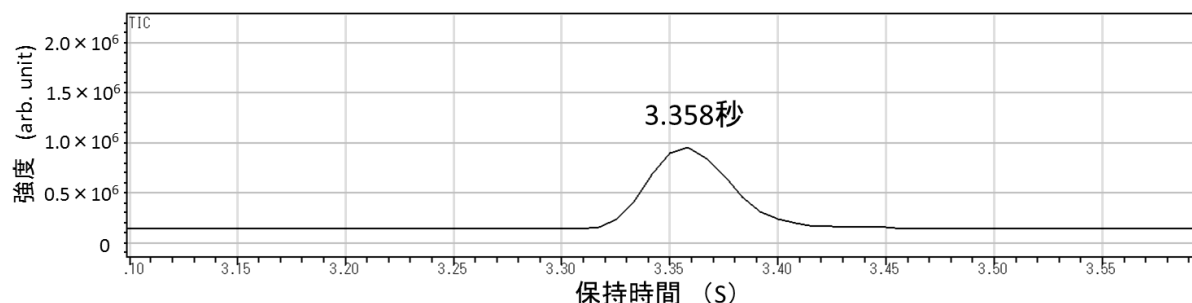


図2 H<sub>2</sub>S標準物質の1000ppmにおけるガスクロマトグラフ

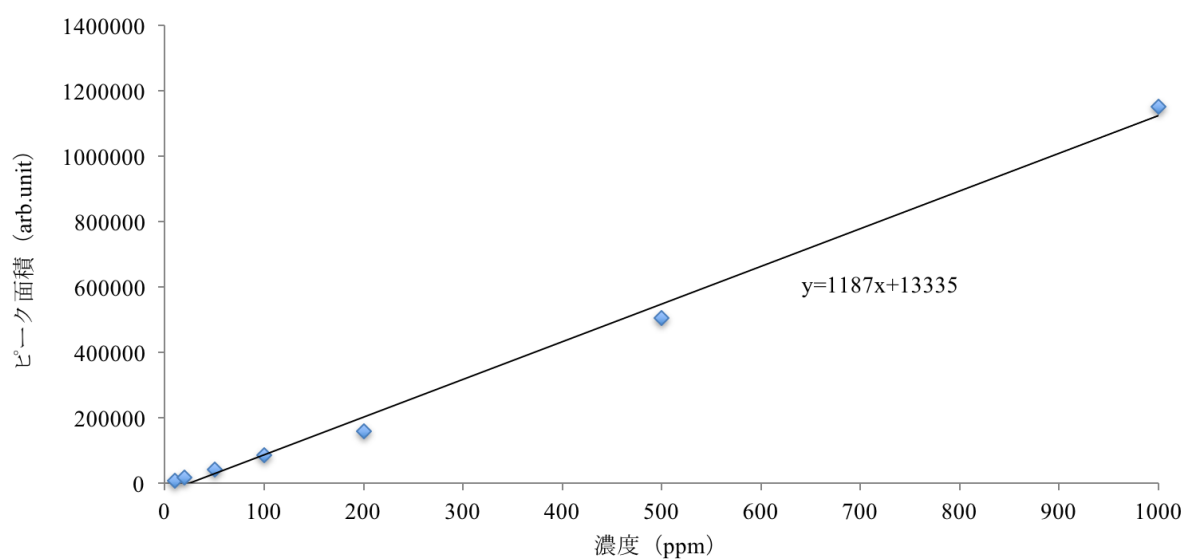


図3 H<sub>2</sub>Sの検量線

## 2) 供試細菌のH<sub>2</sub>S濃度の測定

細菌由来のH<sub>2</sub>S濃度を測定するために、供試細菌は歯周病関連細菌の *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 (*F. nucleatum*), *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (*P. gingivalis*), *Prevotella intermedia* ATCC

25611 (*P. intermedia*), 齧蝕病原性菌の *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (*S. mutans*) を用いた。培養方法は 0.5% 酵母エキス, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ヘミン, 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  メナジオンを含む Brain Heart Infusion (BHI 培地, BD, 東京) を用い, 48 時間嫌気培養した培養菌液 2 mL に含硫アミノ酸である 0.05% L-システインを添加し, あらかじめ 1 日嫌気状態にしておいた 40 mL の培地に接種した。その後, 2 mL ずつアシストチューブ(アシスト, 東京) に分注し, 37°C で嫌気培養を行った。また, 細菌の産生物質が漏れるのを防止するためにシリコーンゴムをアシストチューブに被せた。H<sub>2</sub>S 濃度測定の際にはアシストチューブ内の気体をガスタイトシリンジにて 3 mL 採取し, 直ちにガスクロマトグラフィーに注入し, H<sub>2</sub>S のピーク面積を算出した。一般的な細菌増殖曲線を参考にして最初の 2 日間は 8 時間おきに, その後は 1 日おきに 1 週間測定した。

### 3) *F. nucleatum* に各種 HDT を添加した試料の H<sub>2</sub>S 濃度の測定

最も H<sub>2</sub>S を産生した菌 (*F. nucleatum*) のみについて, 同様の方法で培養した L-システイン添加の菌液を 2 mL ずつアシストチューブに分注し, 37°C で嫌気培養を行った。次に MgHDT 試料, MgHDT500 試料, ZnHDT 試料を 0.02 g 加えたものと HDT なしの 4 種類を作製し, 供試した。また, 2) と同様の方法で, H<sub>2</sub>S 濃度の測定を行った。測定時間は 2 時間おきに 8 時間行い, 合

計 3 回 繰 り 返 し た .

### 3 . 細 菌 増 殖 試 験

MgHDT, MgHDT500, ZnHDT 試料の細菌発育への影響を検討するために *F. nucleatum* の増殖試験を行った . H<sub>2</sub>S 濃度の測定と同様に菌液を培養し , アシストチューブに 4 mL ずつ分注後 , 0.04 g の MgHDT, MgHDT500, ZnHDT 試料を別々に加えて 37℃ で嫌気培養を行った . 菌液を接種後 , 培養液の OD 値を分光光度計にて 600nm の波長により , 4 時間おきに 30 時間まで測定し , 経時的な増殖曲線を求めた . また , 細菌増殖曲線にて HDT を添加していない菌液の OD 値が 1.0 に到達した時間における各種 HDT を添加した菌液の生菌数を Colony Forming Unit (CFU/ml) にて算出した .

### 4 . 統 計 処 理

すべてのデータは , 一元配置分散分析と Fisher's PLSD test の多重比較検定による有意差検定 ( $\alpha = 0.05$ ) を行った .

## 結 果

### 1 . HDT の XRD 結果

#### 1 ) MgHDT

図 4 に合成した MgHDT 試料粉末の 10-80℃ における XRD (a) を示す. 典型的な MgHDT の回折線図 (b) と比較するとピークの回折角と強度はほとんど一致しており, MgHDT の構造をもっていた.

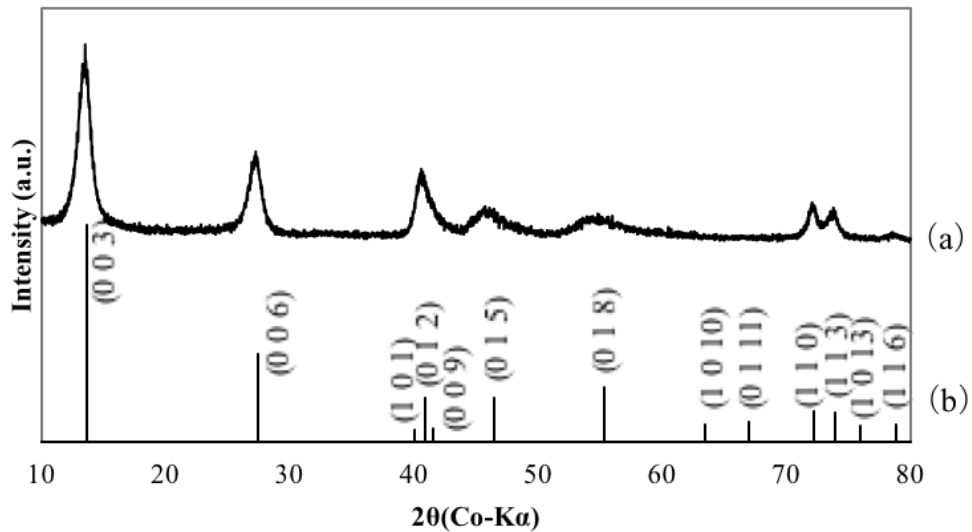


図 4 合成した MgHDT 試料 (a) の X 線回折図形と PDF#35-0964 (MgHDT) (b) の X 線回折線図

## 2) MgHDT500

500°C 30 分の熱処理を施した試料粉末の 10-80°C における XRD (a) を図 5 に示す。回折線はブロードであるが, MgO (b) のピーク位置, 強度と比較的よく一致していた。しかし, (111) に相当するピークは (b), (c) と比べて低角であり, アモルファス相の存在を示唆した。

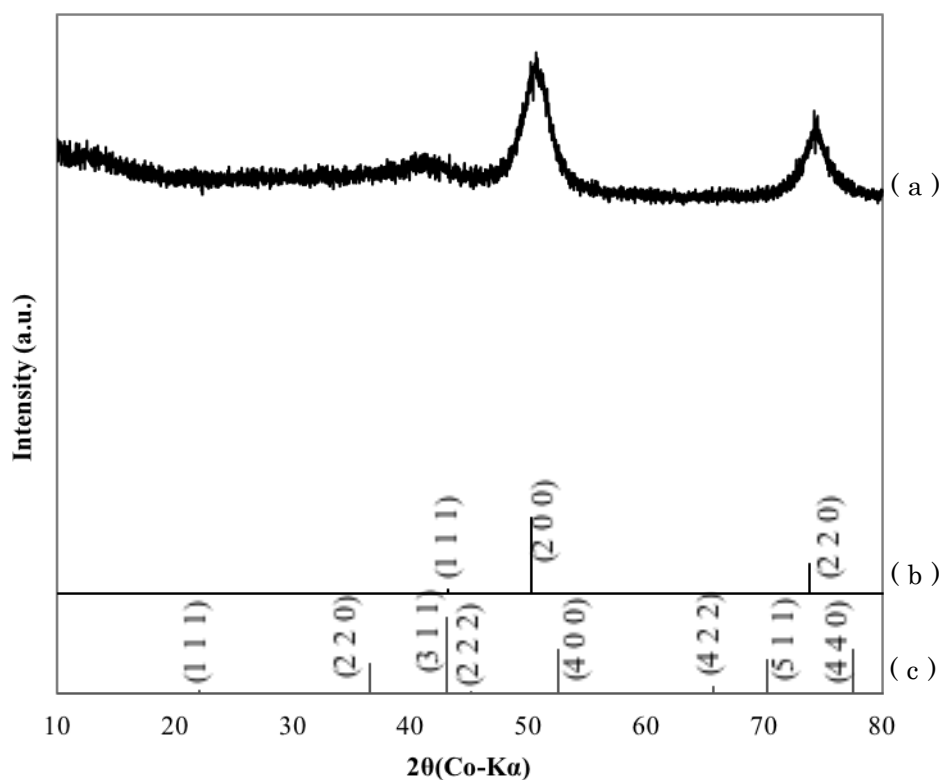


図 5 合成した MgHDT500(a)と PDF#45-0946 (MgO, b), PDF#05-0672 (Mg<sub>2</sub>AlO<sub>4</sub>, c) の X 線回折線図

### 3) ZnHDT

図 6 に得られた ZnHDT 試料粉末の 10-80°C における XRD (a) を示す. 典型的な ZnHDT  $[Zn_{1-x}Al_x(OH)_2][A^{n-}_{x/n} \cdot mH_2O]$  ( $A^{n-} : CO_3^{2-}$ ,  $x=0.33$ ) の回折線図 (b) と比較すると, ピークの回折角と強度はほとんど一致しており, ZnHDT 型層状複水酸化物の構造を持つと考えられた. また, MgHDT 試料に比べ, すべてのピークにおいて回折線の半値幅が小さく, 結晶子が大きく結晶性が高かった.

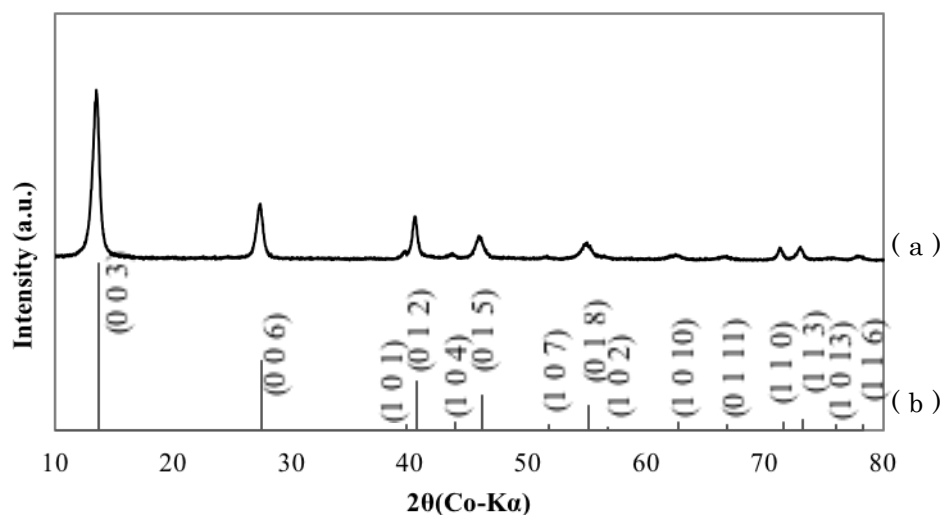


図 6 合成した ZnHDT 試料 (a) の粉末 X 線回折図形と PDF#48-1025 (ZnHDT) (b) の X 線回折線図

## 2. HDT の FT-IR 分析結果

### 1) MgHDT

図 7 に合成した MgHDT 試料の赤外吸収スペクトルを示す。3400 cm<sup>-1</sup> 近傍，900-1100 cm<sup>-1</sup> 付近の吸収ピークはそれぞれ水酸基の水素結合の伸縮振動および変角振動による。また，3000 cm<sup>-1</sup> 付近の吸収ピークは層間水とアニオンの水素結合である。炭酸イオンは，炭酸イオンの吸収ピーク（1340-1380 cm<sup>-1</sup>，850-880 cm<sup>-1</sup>，670-690 cm<sup>-1</sup>）に近いところにも吸収ピークが確認される。さらに，1400 cm<sup>-1</sup> 近傍，1340-1400 cm<sup>-1</sup> のダブルバンドも見られるが，炭酸イオンの対称性低下を示唆している。1625 cm<sup>-1</sup> 付近の吸収ピークは層間水の伸縮振動，400-560 cm<sup>-1</sup> および 785 cm<sup>-1</sup> は Al-O 結合の振動である。

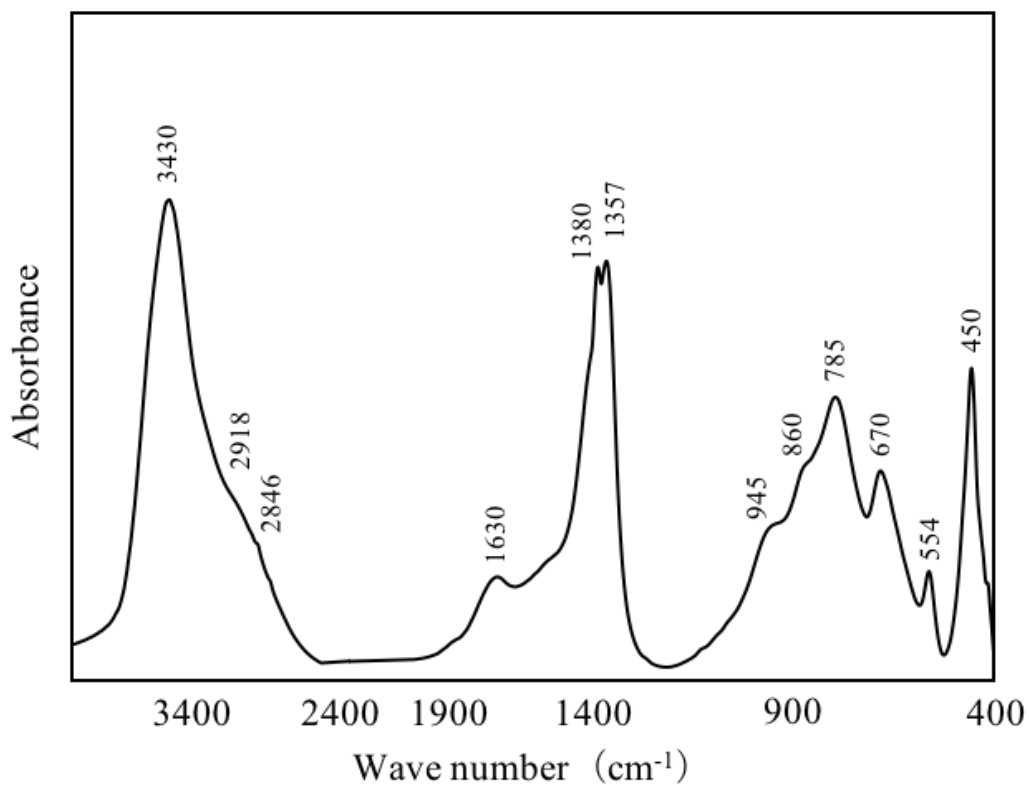


図 7 合成した MgHDT 試料の赤外吸収スペクトル図形

## 2) MgHDT500

図 8 に得られた MgHDT500 試料の赤外吸収スペクトルを示す。炭酸イオンの吸収ピーク ( $1340-1380\text{ cm}^{-1}$ ,  $850-880\text{ cm}^{-1}$ ,  $670-690\text{ cm}^{-1}$ ) はほとんど確認されなかった。また,  $3400\text{ cm}^{-1}$  近傍,  $900-1100\text{ cm}^{-1}$  付近の水の吸収ピークが確認された。また,  $400-800\text{ cm}^{-1}$  は M-O, O-M-O (M: Mg, Al) の格子振動の吸収ピークである。



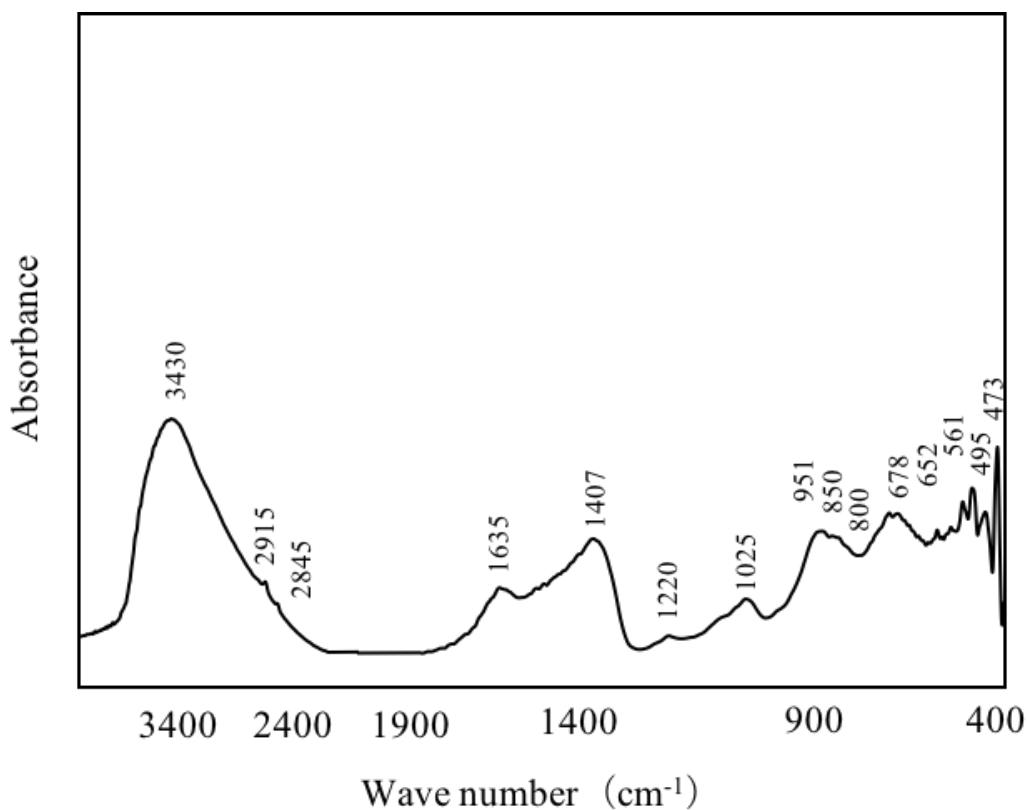


図 8 合成した MgHDT500 の赤外吸収スペクトル図形

### 3 ) ZnHDT

図 9 に合成した ZnHDT 試料の赤外吸収スペクトルを示す。MgHDT 試料と同様に、 $3400\text{ cm}^{-1}$  近傍、 $900\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$  付近の吸収ピークは水酸基の水素結合の伸縮振動および変角振動、 $3000\text{ cm}^{-1}$  付近の吸収ピークは層間水とアニオンの水素結合、 $1500$ 、 $1625\text{ cm}^{-1}$ 、 $1340\text{--}1380\text{ cm}^{-1}$ 、 $850\text{--}880\text{ cm}^{-1}$ 、 $670\text{--}690\text{ cm}^{-1}$  付近の吸収ピークは層間水の伸縮振動および炭酸イオンの吸収ピークが確認された。また、 $1737\text{ cm}^{-1}$  に  $\text{C}=\text{O}$  の吸収ピークが確認された。 $400\text{--}800\text{ cm}^{-1}$  には  $\text{M-O}$ 、 $\text{O-M-O}$  ( $\text{M}:\text{Zn, Al}$ ) の格子振動の吸収ピークが見られ、 $552\text{ cm}^{-1}$  は  $\text{Al-OH}$ 、 $615\text{ cm}^{-1}$

は Zn-OH の吸収ピークである。

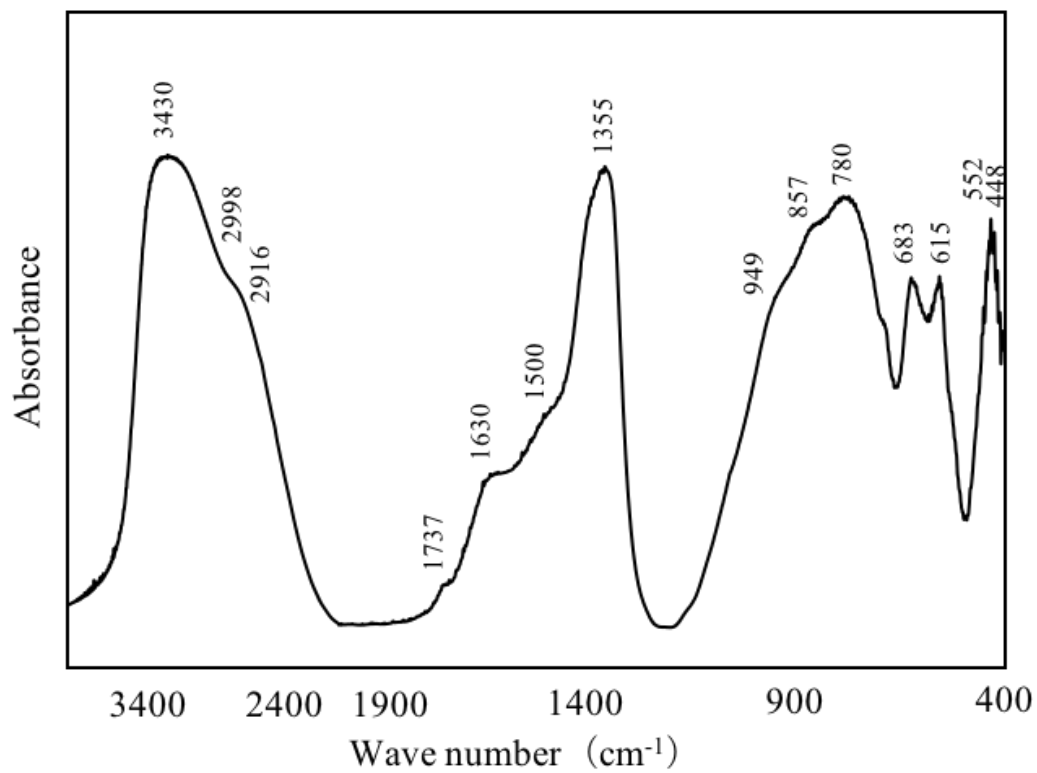


図 9 合成した ZnHDT 試料の赤外吸収スペクトル図形

### 3. HDT の SEM 像と EDS 分析結果

#### 1) MgHDT

図 10 に合成した MgHDT 試料の SEM 像, EDS 分析プロフィールを示す. 得られた合成試料は 0.2-0.3 μm 程度の粒子が凝集し, 数 μm 程度の二次粒子を形成していた. EDS 元素分析の結果 (n=5, atomic%), Mg は  $66.2 \pm 1.1$ , Al は  $33.8 \pm 1.1$ , Mg/Al 比は  $2.0 \pm 0.1$  であり,  $[\text{Mg}_{1-x}\text{Al}_x(\text{OH})_2][\text{A}^{n-}_{x/n} \cdot m\text{H}_2\text{O}] (\text{A}^{n-} : \text{CO}_3^{2-}, x=0.33)$  組成のものが得られた.

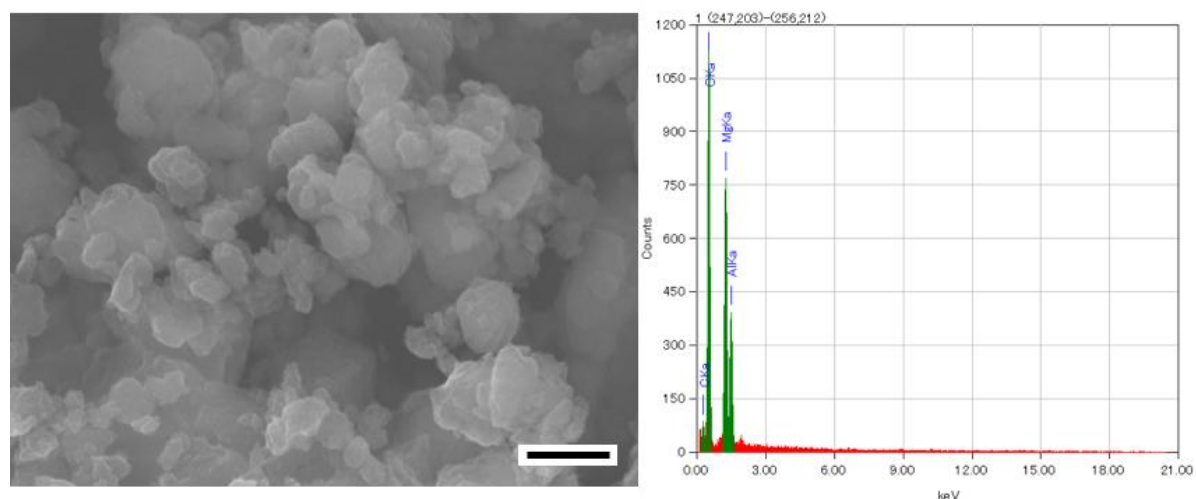


図 10 合成した MgHDT 試料の SEM 像 (左) と EDS プロファイル (右): スケールは 1 μm, 緑色は EDS 分析対象元素のピーク強度で赤色はそれ以外の強度を示す

## 2) MgHDT500

図 11 に合成した MgHDT500 試料の SEM 像，EDS 分析プロファイルを示す．熱処理前の MgHDT 試料で確認された  $0.2\text{-}0.3\mu\text{m}$  程度の粒子の凝集はなくなり，粒子同士が接着し，粒子間の隙間が小さくなっていた．EDS 元素分析の結果 ( $n=5$  , atomic%) , Mg は  $65.8\pm 0.9$  , Al は  $34.2\pm 0.9$  , Mg/Al 比は  $1.9\pm 0.1$  であり，熱処理前の Mg/Al 比は  $2.0\pm 0.1$  とほぼ変化はなかった．

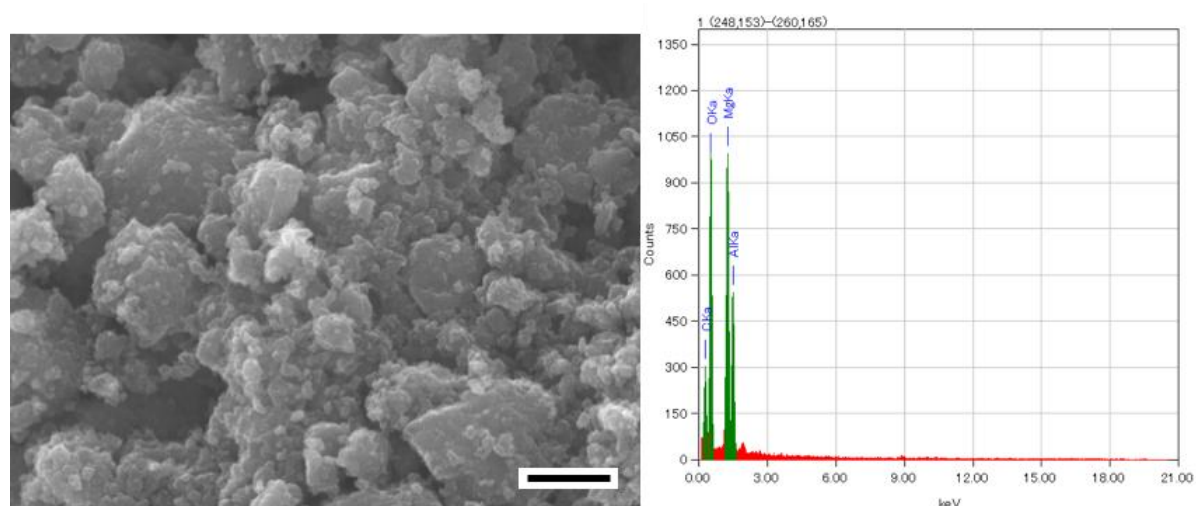


図 11 合成した MgHDT500 の SEM 像（左）と EDS プロファイル（右）：スケールは  $1\mu\text{m}$  ，緑色は EDS 分析対象元素のピーク強度で赤色はそれ以外の強度を示す

### 3) ZnHDT

図 12 に合成した ZnHDT 試料の SEM 像，EDS 分析プロファイルを示す．得られた合成試料は 0.2-0.3 $\mu\text{m}$  程度の板状晶であることが確認された．MgHDT と異なり，粒子の凝集もなく，均一な粒子が得られた．EDS 元素分析の結果（ $n=5$ ，atomic%），Zn は  $66.3\pm 2.0$ ，Al は  $33.7\pm 2.0$ ，より Zn/Al 比は  $2.0\pm 0.2$  であり， $[\text{Zn}_{1-x}\text{Al}_x(\text{OH})_2][\text{A}^{n-}_{x/n}\cdot m\text{H}_2\text{O}]$ （ $\text{A}^{n-} : \text{CO}_3^{2-}$ ， $x=0.33$ ）組成のものが得られた．

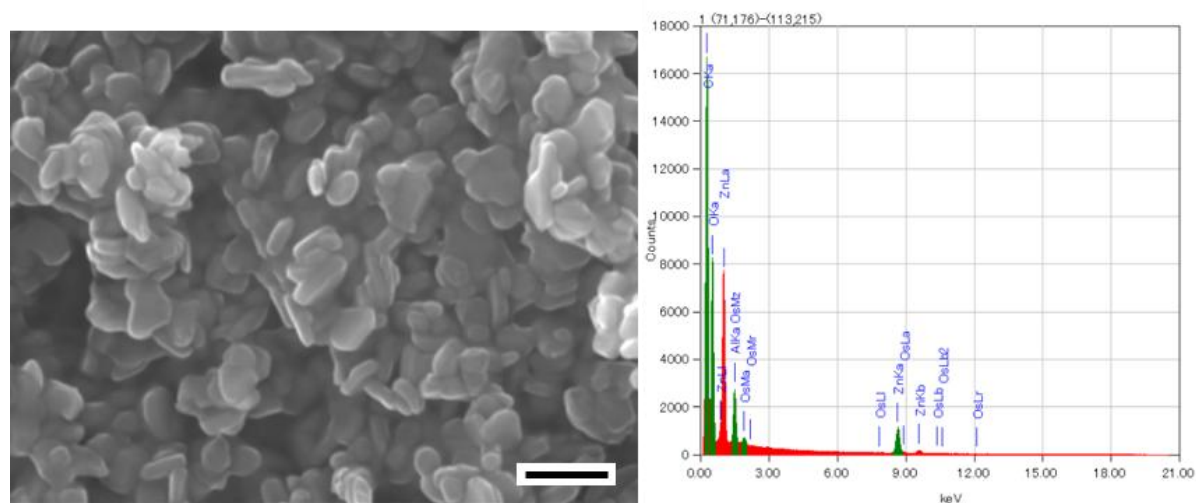


図 12 合成した ZnHDT 試料の SEM 像（左）と EDS プロファイル（右）：スケールは 1  $\mu\text{m}$ ，緑色は EDS 分析対象元素のピーク強度で赤色はそれ以外の強度を示す

#### 4. 各種供試菌の H<sub>2</sub>S 濃度

図 13 に示すように各菌液とも H<sub>2</sub>S の産生を認めたが、*P. gingivalis* と *F. nucleatum* が最初の 8 時間で最も産生し、その後、経時的に減少した。*P. intermedia* は 40 時間後でピークに達し、その後減少した。最も H<sub>2</sub>S を産生したのは *F. nucleatum* であった。

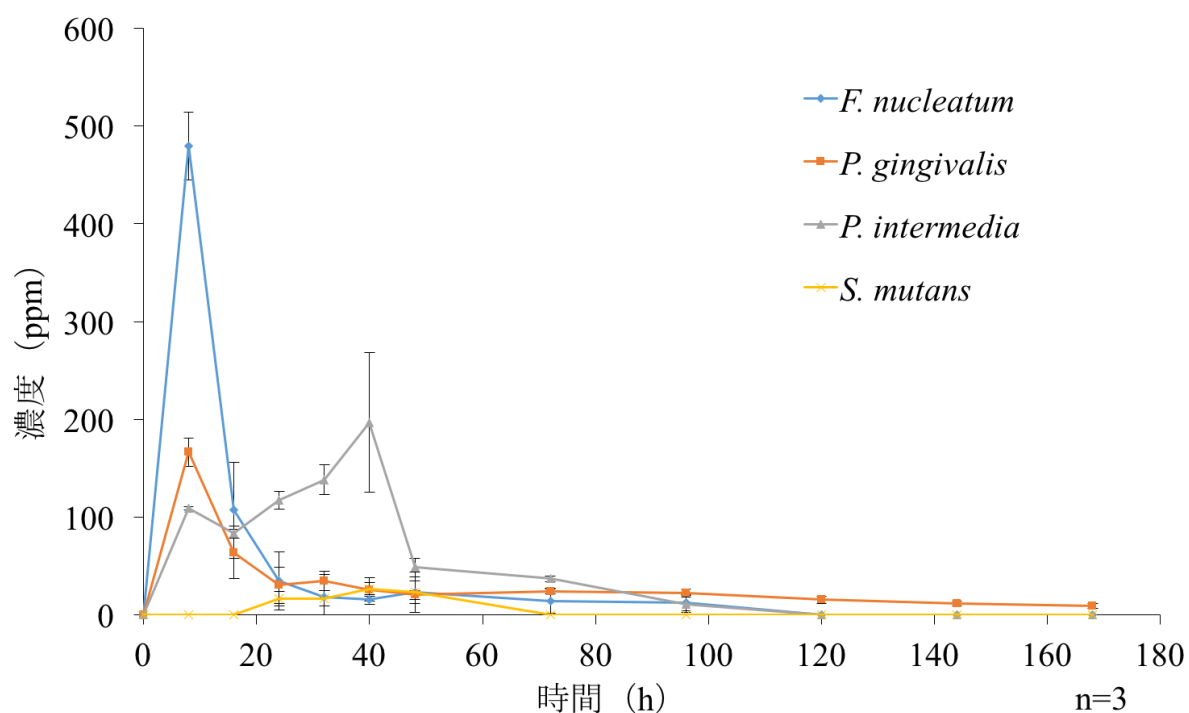


図 13 各種供試菌の H<sub>2</sub>S 濃度の平均値の経時的変化

#### 5. *F. nucleatum* に各種 HDT を混入した試料の H<sub>2</sub>S 濃度

図 14 に示すように HDT なし (Cont.) の場合と比較すれば、各種 HDT を混入した試料の H<sub>2</sub>S 濃度の経時的変化は、熱処理なしの MgHDT 試料と 500℃ で熱処理した MgHDT500 試料が 2 時間を経過したところでは両

試料とも  $H_2S$  濃度の減少は見られなかった。しかし、6 時間経過すると、MgHDT500 試料の  $H_2S$  濃度の減少は著明となり、8 時間後では Cont. の試料の  $H_2S$  濃度を 100% とすると 50% 以下の減少を示した。一方、ZnHDT 試料は 2 時間を経過したところでほぼ 100% の減少を示し、8 時間経過後でもほぼ 100% に近い  $H_2S$  を吸着した。8 時間後の各試料の  $H_2S$  濃度を有意差検定したところ、ZnHDT 試料は他の 3 試料に比べて有意に低下したが、MgHDT と MgHDT500 試料には有意差はなかった。さらに、Cont. の試料と MgHDT 試料との間にも有意差はなかった (図 15)。

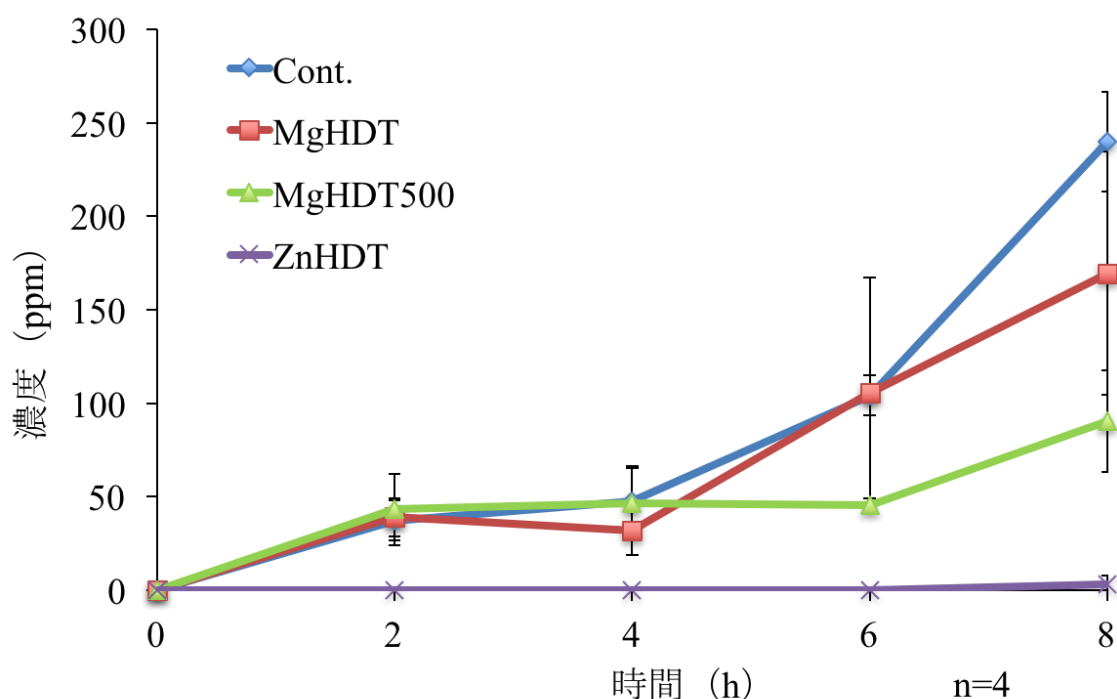


図 14 *F. nucleatum* に各種 HDT を混入した試料の  $H_2S$  濃度の経時的変化

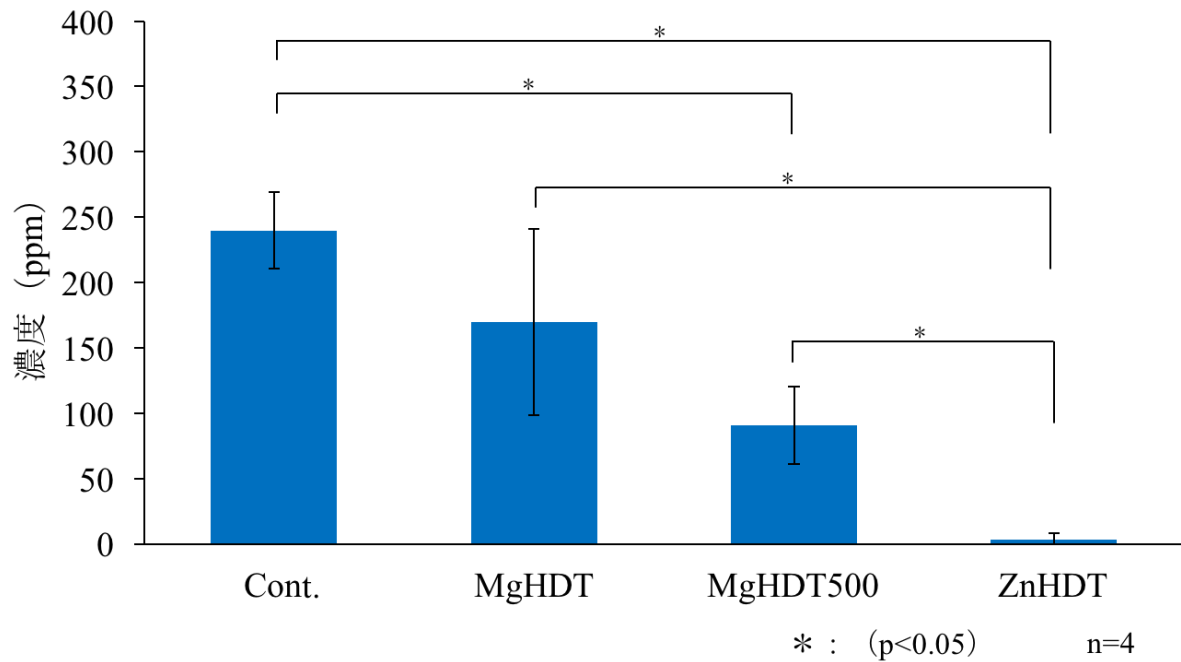


図 15 8 時間後の *F. nucleatum* に各種 HDT を混入した試料の H<sub>2</sub>S 濃度

## 6. 各種 HDT の *F. nucleatum* 発育に与える影響

### 1) 細菌増殖への影響

HDT なし (Cont.) の場合の *F. nucleatum* は 8 時間程度から対数増殖期を迎え, 約 24 時間まで吸光度の増加を認めてその後は緩やかに低下していった. MgHDT と MgHDT500 試料を加えることによる曲線の変化は少なく, 菌への発育への影響は少なかった. しかし, ZnHDT 試料を加えた場合は曲線の変化を認め, 2 時間経過以降は顕著な増殖を認めず, 30 時間経過後まで持続して, *F. nucleatum* 発育に対して抑制していた (図 16). 30 時間経過後の細菌増殖について各試料の有意差検定を行ったところ, ZnHDT 試料は他の



3 種類 の 試 料 に 比 べ て 有 意 に 菌 の 増 殖 を 抑 制 し て い た ( 図 17 ) .

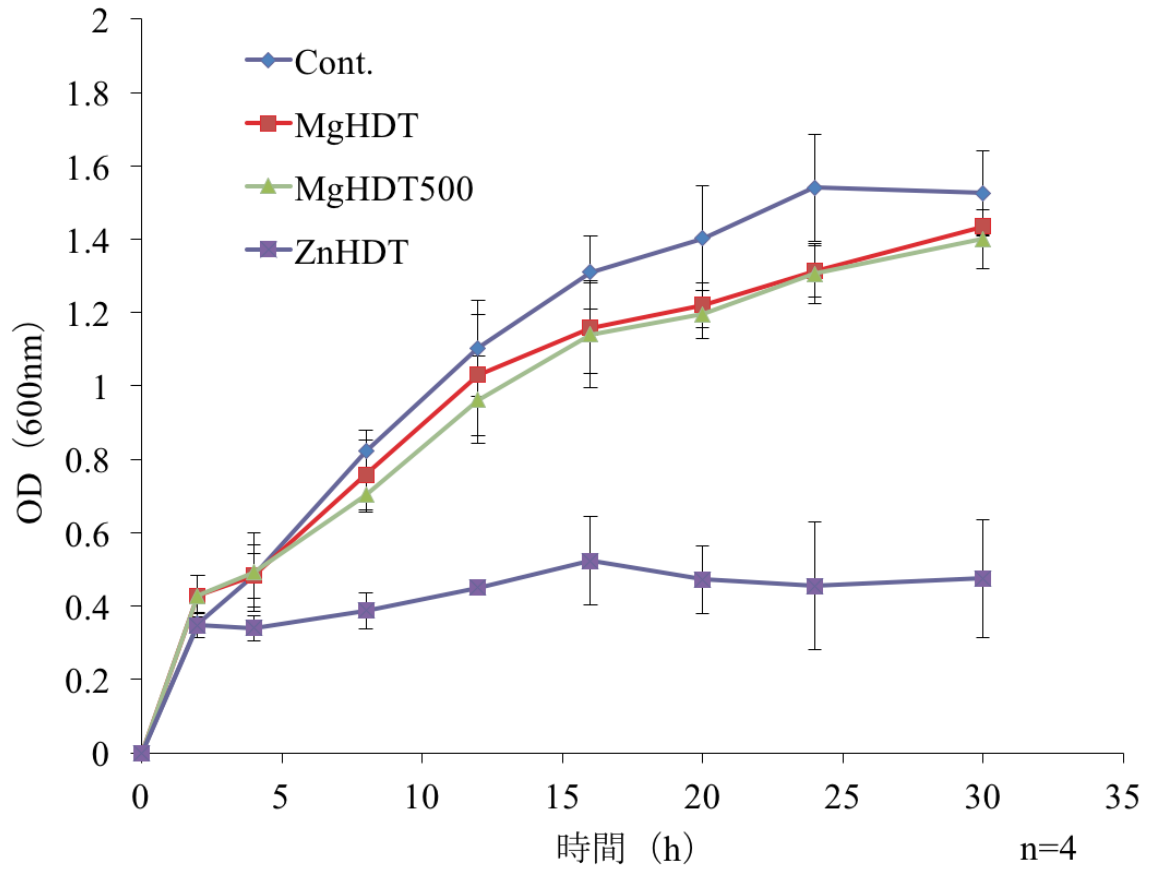


図 16 各種 HDT の *F. nucleatum* の 発 育 に 与 える 影 響 ( 細 菌 増 殖 曲 線 )

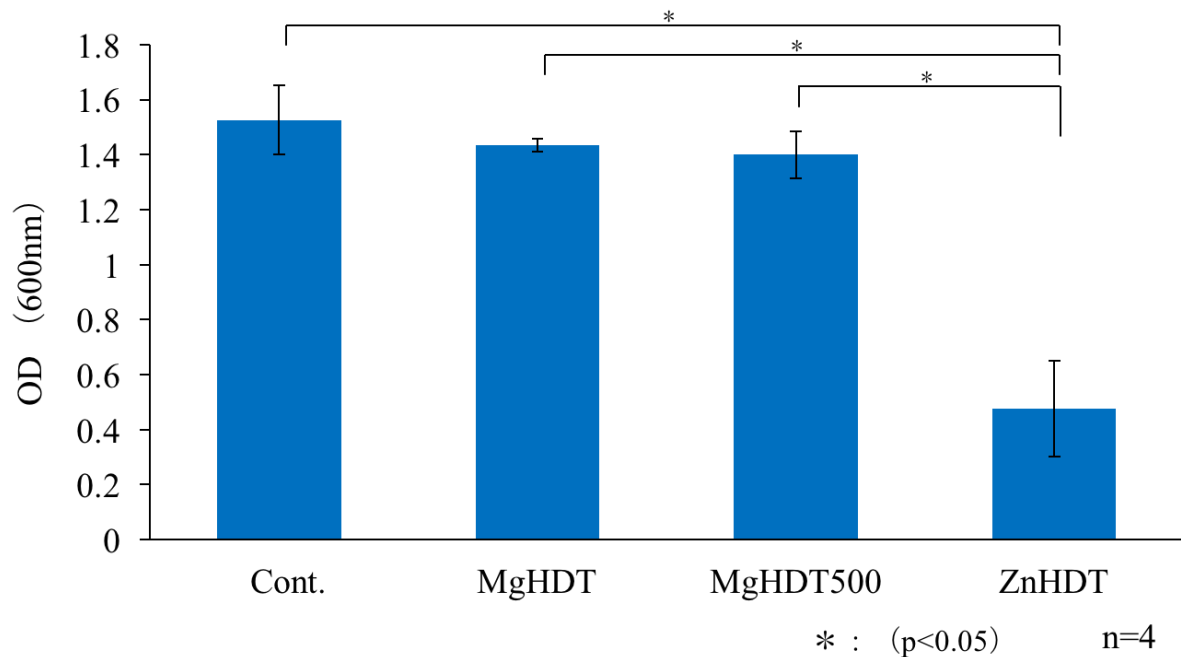


図 17 各種 HDT の *F. nucleatum* の発育に  
与える影響 (30 時間後)

## 2) 生菌数 (CFU) への影響

細菌増殖曲線にて HDT を添加していない菌液の OD 値が 1.0 に到達した時間における各種 HDT を添加した *F. nucleatum* の生菌数を CFU/ml により測定したところ, HDT なし (Cont.) が  $9.6 \times 10^7$ , MgHDT が  $1.0 \times 10^8$ , MgHDT500 が  $8.6 \times 10^7$  に対して ZnHDT 試料は  $3.4 \times 10^6$  と有意にコロニー数は低下しており, *F. nucleatum* の発育抑制を認めた (図 18).

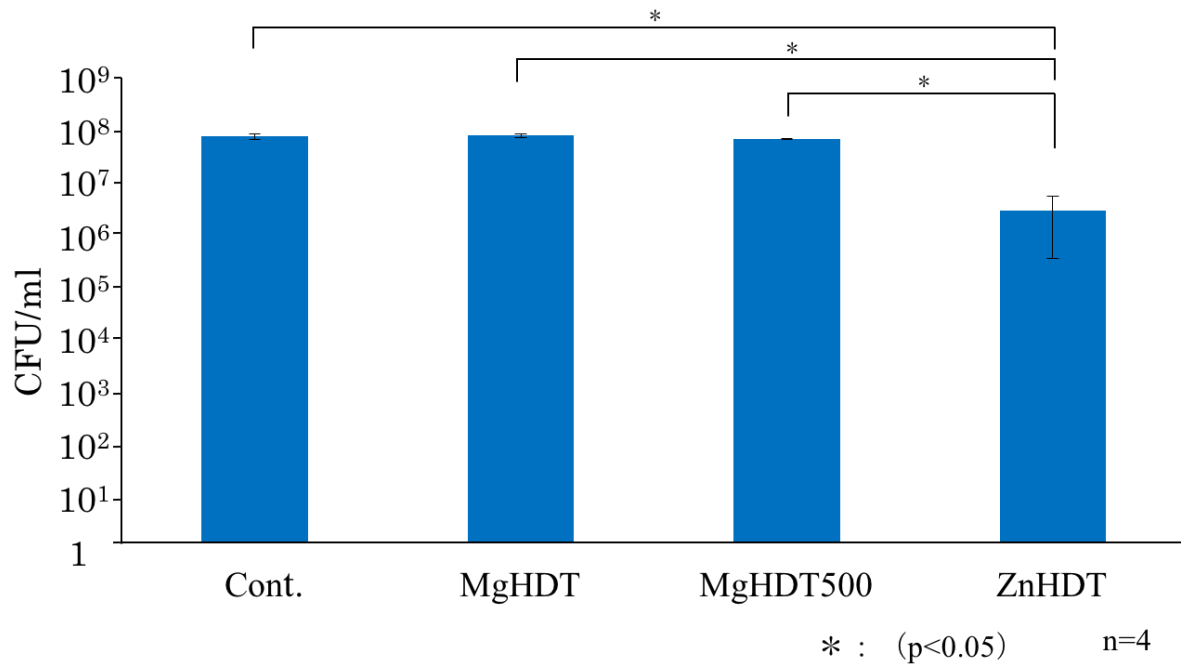


図 18 各種 HDT の *F. nucleatum* の生菌数に与える影響

## 考 察

VSC は口臭の主要原因物質であるだけでなく，細胞組織に対する毒性が強く，歯周病の増悪因子<sup>12)</sup>で，線維芽細胞における DNA 合成，蛋白合成，コラーゲン合成の阻害などの毒性が報告されている<sup>19-21)</sup>．また，このような VSC を産生する口腔内細菌の増殖を抑制することによって，口気中の VSC 量を減少させることは口臭を抑制するだけでなく，歯周病の発生や増悪の防止に非常に有効と考えられる<sup>22)</sup>．

一方，Yokogawa ら<sup>23)</sup>は，ミクロ孔を持ち化学的に安定な HDT を合成し，代表的な VSC である  $H_2S$  に対する吸着の定量分析をガスクロマトグラフで測定しており，より吸着能の優れた素材の開発に取り組んでいる．2 nm 以下の nano オーダーの孔を持つセラミックス多孔体は生体親和性に優れ，低分子を吸着する<sup>24)</sup>．VSC は揮発性であるが，口腔内で産生した VSC は唾液中に溶解し，揮発することにより悪臭となる．したがって，口腔内は唾液に満たされており，液相中での  $H_2S$  等の除去が必要不可欠である．HDT は液相中での各種イオンの吸着や取り込みが報告<sup>25, 26)</sup>されており，各種 HDT (MgHDT, MgHDT500, ZnHDT) を合成した．それら共沈法で合成した各 HDT は MgHDT, MgHDT500, ZnHDT であることを X 線回折 (XRD)，フーリエ変換赤外分光分析，さらに，FE-SEM で観察し，EDS 分

析し，確認した．MgHDTとZnHDTは炭酸型であること，MgHDT500は層間に含まれる層間水および炭酸イオン，構造水の脱離が確認された．これら確認された各種HDTについて検討した．その方法として，口腔内の環境をそのまま再現することは難しい．今回の液体培地における実験環境は，通常の患者のVSC産生量（ppbオーダー）よりも今回のVSC産生量（ppmオーダー）ははるかに多く，さらに苛酷な環境と考えられる．さらに，口腔内と同様な現象が生じているとも考えられることから，*in vitro*での基礎的な検討として，供試菌培養下に3種類のHDTを混入した場合のVSC濃度を測定し，供試したVSC吸着材の性能との関連について詳細に検討した．

また，Yokogawaら<sup>27)</sup>は水中でのH<sub>2</sub>S除去実験を行い，MgHDTは，水中，気体中のH<sub>2</sub>S濃度はほとんど低下しなかったと述べている．また，MgHDT500は気体中では直ちに低下し，水中では一旦上昇後，急激にH<sub>2</sub>S濃度が低下したと報告している．さらに，Yokogawaら<sup>27)</sup>はMgHDTとMgHDT500の吸着について以下のような考察をしている．HDTの一般式は $Mg_{1-x}Al_x(OH)_2A^{n-}_{x/n}mH_2O$ の組成（ $A^{n-}$ ：CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>，OH<sup>-</sup>など）である．つまり，層状複水酸化物であり，層間に溶媒和として分子を取り込み，陰イオン交換能を有する．層間陰イオン $A^{n-}$ が炭酸イオンである炭酸型を加熱処理すると層間水および層間炭酸イオンが脱離し，

MgAl 酸化物になり，水中で陰イオンと水分子を取り込み，元の層状構造に再生する．MgHDT が示した吸着は，層間のアニオンが置換する物理吸着がより支配的であり， $H_2O$  と  $H_2S$  を比較すると酸素（O）は硫黄（S）より電気陰性度が高く，イオン化しやすいために，極性分子を吸着しやすい MgHDT は水分子の吸着を優先している．これに比べて水中の  $H_2S$  の吸着量が多かった MgHDT500 の吸着は，構造再生反応に伴う層間への吸着で，化学結合が変わり，構造が変化する過程における吸着で化学結合が優越するとし，MgHDT を熱処理することにより，VSC 濃度を低減できたとしている．

本研究では，共沈法で合成した MgHDT および熱処理した MgHDT である MgHDT500 で *F. nucleatum* が産生した  $H_2S$  の吸着を検討した．また，*F. nucleatum* の細菌発育への影響を細菌増殖（OD 値）と生菌数（CFU）により検討した．さらに Mg を Zn に置換した新規 ZnHDT について同様の試験を行った．その結果，熱処理なしの MgHDT 試料と  $500^{\circ}C$  で熱処理した MgHDT500 試料は HDT なしの試料に比べて，2 時間を経過したところでは両試料とも  $H_2S$  濃度の減少は見られなかった．しかし，6 時間経過すると，MgHDT500 試料は減少が著明となり，8 時間後では 50% 以下の減少を示した．一方，ZnHDT 試料は 2 時間を経過したところでほぼ 100% の減少を示し，8 時間経過後でもほぼ 100% の  $H_2S$

を吸着した。つまり， $H_2S$  吸着において今回使用した MgHDT は熱処理する (MgHDT500) と吸着量は増加し，カチオンを Zn に交換するとさらに大きな吸着量を示した。また，ZnHDT は *F. nucleatum* の増殖を抑制し，抗菌性を示した。これらのことから，*F. nucleatum* が産生した  $H_2S$  濃度の著しい低下は ZnHDT の硫化物に対する吸着性によるものと口腔細菌そのものの増殖を抑制する作用 (抗菌性) によることが本実験から示唆された。したがって，Zn を含むセラミックス多孔体である ZnHDT は液相環境に保持しておいても VSC を効率的に除去でき，VSC を発生する細菌に対して抗菌性を示すことから唾液や口腔内細菌の影響が考えられる口臭抑制に効果的であり，臨床応用に有用であることが示唆された。

## 結 論

吸着能の優れた HDT の開発に取り組み、MgHDT、それを 500℃ で熱処理した MgHDT500、MgHDT の Mg を Zn に置換した ZnHDT を合成した。その合成物の H<sub>2</sub>S 吸着能を検討するため、H<sub>2</sub>S を産生する偏性嫌気性菌の歯周病関連菌 *F. nucleatum* を用い、各種 HDT の H<sub>2</sub>S 産生量を抑制する効果を検討した。また、供試菌の増殖度と HDT との関係（抗菌作用）も検討し、臨床応用が可能な材料であるかどうか評価した。その結果、以下の結論を得た。

1. 共沈法で合成した各 HDT は MgHDT、MgHDT500、ZnHDT であることを X 線回折 (XRD)、フーリエ変換赤外分光分析、さらに、FE-SEM で観察し、EDS 分析し、確認した。

2. 3 菌種の歯周病関連細菌と 1 菌種の齲蝕病原性菌の中で、最も多く H<sub>2</sub>S を産生した *F. nucleatum* の菌液を添加した液体培地に各種 HDT を混入した試料の細菌由来の H<sub>2</sub>S の吸着を検討し、ZnHDT は 2 時間を経過したところで 100% の吸着を示し、8 時間経過後でもほぼ 100% の H<sub>2</sub>S を吸着した。

3. 各種 HDT の *F. nucleatum* の発育に与える影響を培養液の OD 値と生菌数 (CFU) で評価し、OD 値と生菌数ともに ZnHDT 試料は他の 2 種類の試料に比べて有意に菌の増殖を抑制していた。



## 引用文献

- 1 ) 白井健雄 , 上田雅俊 , 今井久夫 . 各種口臭消臭剤の効果について . 日歯保存誌 . 2004 ; 47 : 650-659 .
- 2 ) 齋藤幸枝 , 大森みつき , 葛城啓彰 . 生理的口臭の要因に関する研究 . 日歯周誌 . 2002 ; 44 : 168-177 .
- 3 ) Armstrong BL , Sensat ML and Stoltenberg JL . Halitosis : a review of current literature . *J Dent Hygiene* . 2010 ; 82 : 5-75 .
- 4 ) Rosenberg M . Clinical assessment of bad breath : current concepts . *J Am Dent Assoc* . 1996 ; 127 : 475-482 .
- 5 ) Tonzetich J . Direct gas chromatographic analysis of sulphur compounds in mouth air in man . *Archs Oral Biol* . 1971 ; 16 : 587-597 .
- 6 ) Loesche WJ and Kazor C . Microbiology and treatment of halitosis . *Periodontology 2000* . 2002 ; 28 : 256-279 .
- 7 ) 角田正健 . 口臭の診断と治療 . *Dental Magazine* . 2002 ; 105 : 32-41 .
- 8 ) 八重垣 健 . 口臭臨床の実際ーヘルスプロモーションと口臭物質の病原性 . 日歯医師会誌 . 2005 ; 58 : 27-38 .
- 9 ) 高橋雅洋 , 岸 光男 . 舌苔中の歯科疾患関連細菌と口腔内状態との関連性 . 口腔衛生会誌 . 2006 ;

- 56:137-147.
- 10) Persson S, Edlund MB, Claesson R and Carlsson J. The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 1990; 5: 195-201.
  - 11) Ng W and Tonzetich J. Effect of hydrogen sulfide and methyl mercaptan on the permeability of oral mucosa. *J Dent Res.* 1984; 63: 994-997.
  - 12) Yaegaki K and Sanada K. Volatile sulfur compounds in mouth air from clinically healthy subjects and patients with periodontal disease. *J Periodont Res.* 1992; 27: 233-238.
  - 13) De Boever EH and Loesche WJ. Assessing the contribution of anaerobic microflora of the tongue to oral malodor. *J Am Dent Assoc.* 1995; 126: 1384-1393.
  - 14) Yasukawa T, Ohmori M and Sato S. The relationship between physiologic halitosis and periodontopathic bacteria of the tongue and gingival sulcus. *Odontology.* 2010; 98: 44-51.
  - 15) Kuroshita R, Amano S, Takahashi S, Sakagami H, Ohmori Y and Watanabe S. Relation between counts periodontopathic bacteria in the tongue coat of healthy subjects and the connection of volatile sulfur compounds in their breath. *Pediatric Dent J.*

- 2010; 20: 57-64.
- 16) Kuroshita R, Amano S, Takahashi S, Sakagami H, Ohmori Y and Watanabe S. Production of volatile sulfur compounds by periodontopathic bacteria in anaerobic cultures. 明海歯学. 2010; 39: 1-5.
- 17) Kakuta E, Ohshima T, Nakagawa Y and Maeda N. Relationship between two bacterial species and oral malodor. 鶴大歯誌. 2009; 35: 1-8.
- 18) 藤井和夫, 長谷川義明, 村上幸孝, 土井 豊, 横川善之, 堀田正人. 揮発性硫黄化合物の金銀パラジウム合金に対する変色抑制効果. 日歯保存誌. 2014;57: 229-238.
- 19) Johnson PW, Ng W and Tonzetich J. Modulation of human gingival fibroblast cell metabolism by methyl mercaptan. *J Periodontal Res.* 1992; 27: 476-483.
- 20) Johnson PW, Yaegaki K and Tonzetich J. Effect of volatile thiol compounds on protein metabolism by human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 1992; 27: 553-561.
- 21) Johnson PW, Yaegaki K and Tonzetich J. Effect of methyl mercaptan on synthesis and degradation of collagen. *J Periodontal Res.* 1996; 31: 323-329.
- 22) Roldan S, Winkel EG, Herrera D, Sanz M and Van

- Winkelhoff A. The effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc lactate on the microflora of oral halitosis patients: a dual-centre, double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 427-434.
- 23) Yokogawa Y, Sano H, Namba S, Fujii K, Morita Y, Hotta M and Doi Y. VSC adsorption capability of layered double hydroxide containing transition metal. *JBBBE.* 2014; 21: 71-74.
- 24) 坊木佳人. 硫化水素ガスの吸着除去に関する研究—多孔性活性炭,ゼオライトによる気相での硫化水素の静的ならびに動的吸着特性. *日衛誌.* 1977; 32: 482-493.
- 25) Fetter G, Olguin MT, Bosch P, Lara VH and Bulbulian S.  $^{131}\text{I}^-$  sorption from aqueous solution by nitrated hydrotalcites. *J Radioanal Nucl Chem.* 1999; 241: 595-599.
- 26) Orthman J, Zhu HY and Lu GQ. Use of anion clay hydrotalcite to remove coloured organics from aqueous solutions. *Separation and Purification Tech.* 2003; 31: 53-59.
- 27) Yokogawa Y, Sano H and Kishida I. Layerd double hydroxide ceramic materials and its  $\text{H}_2\text{S}$  incorporation through topachemical reactions. *J*

*Ceram Soc Jpn.* 2013; 121: 788-791.

