

に舌清掃から全ての口腔清掃を行わせ1日の変化を観察した(図15)<sup>55</sup>。口臭が無い状態が一日中続きなが

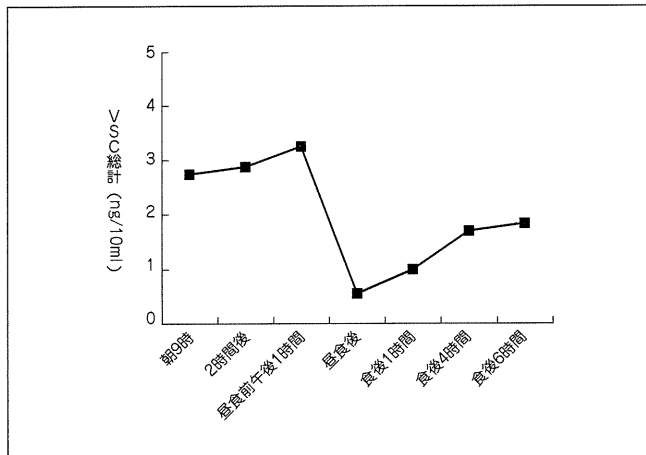


図13 朝食を禁止した場合のVSCs変化<sup>55</sup>  
口臭検査は午前中、朝食等を禁止して実施しなければ正当な診断は得られない。

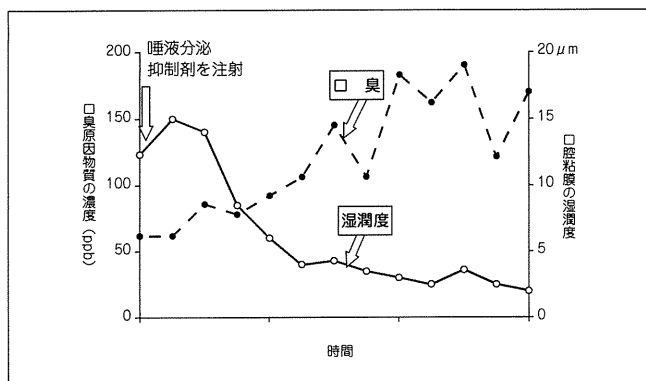


図14 唾液減少による口臭の増加<sup>56</sup>  
唾液分泌の減少は口臭増加の原因となる。しかし、正常人で唾液分泌を増やしても口臭は減少しない。

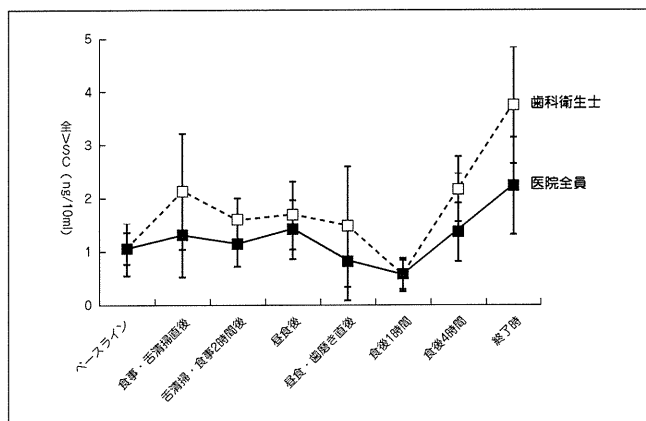


図15 職業ストレスによる口臭<sup>55</sup>  
歯科医療者のストレスと口臭。歯科医院の医療従事者・事務員など21名に、舌清掃などの口臭予防処置を実施しながらVSCsを測定した。すると一日中、口臭が無い状態が続きながら、最も多忙な診療終了前に一挙に増加する。特に歯科衛生士で顕著である。患者が臭う程度に強い。これもストレスに起因すると思われる。

ら、最も多忙な診療終了前、VSCsが異常に高くなる。とくに歯科衛生士で高い。これもストレスのためであろう。女性の生理周期とVSCsの関連を図16に示した<sup>58</sup>。VSCsは排卵期が最も高く、出血期も高い。歯周炎は口臭増加の最大の要因である。歯周炎の程度とVSCs濃度に強い相関を示し、とくにCH<sub>3</sub>SHの比率が高まる(図17)<sup>59</sup>。すなわち歯周炎予防が最良の口臭予防である。多くの論文がこれを支持している<sup>52, 53, 59~61</sup>。一方、「歯周病は関係しない」との誤報が世界の一流学会誌にみられる<sup>62</sup>。すなわち世界的な学者でさえ、平気で「誤り」を学者・開業医に指導する。これが一般の口臭臨床の現状である。

表5 舌苔の臨床的観察<sup>54</sup>

- 舌苔とは……剥離上皮細胞、細菌、白血球、食渣よりなる
- 発現率：健常者 72%  
(種々の疾患における発現率と差なし)
  - 幼年者、高年者に少なく中年に多い
  - 歯周疾患、齲蝕、清掃不良、喫煙で多い
  - 全身疾患とは関係ない
  - 口腔環境と舌苔発生は関連がある

表6 ストレスは口臭を増加させる<sup>57</sup>

	試験前	試験日	試験後
口臭物質 (ppb)	73.6	113.1 ↑	64.0
唾液分泌 (ml/分)	0.52	0.32 ↓	0.57

生化学の試験前、中、後の歯学部学生の口臭・唾液分泌を測定した。試験中は、唾液が減り口臭が増加する。

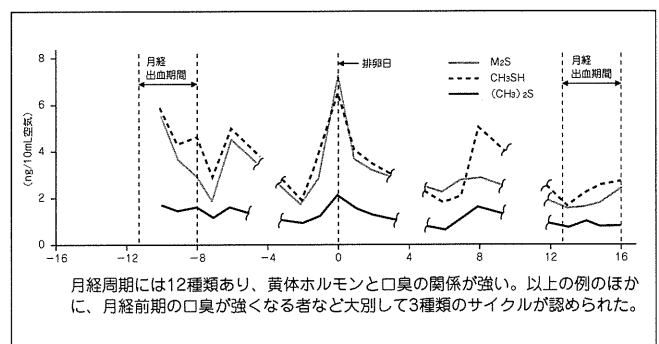


図16 生理周期とVSCs<sup>58</sup>  
月経周期は12種類あり、それに応じた口臭の変化があるが、大別すると3種類になる。黄体ホルモンとの関係が強く、歯周組織が損傷されやすいからと説明されている。

## 歯科保健医療に対する国民の価値観の向上： 疾患原因の治療(表7)

このテーマは、多くの日本の歯科医人には馴染みが無い。一方、欧米では別の意味で馴染みが無い。なぜなら欧米では、空気みたいに当たり前の話だからだ。この目的実現には、「歯科医には歯を削らない重要な仕事がある」との社会的理解を得る必要がある<sup>23)</sup>。そのためには医者のように、病気の原因を治療しなければならない(図18)。

歯科疾患の原因は明らかだ。バイオフィームや歯石である。これを治療するのが歯科である。すなわち予

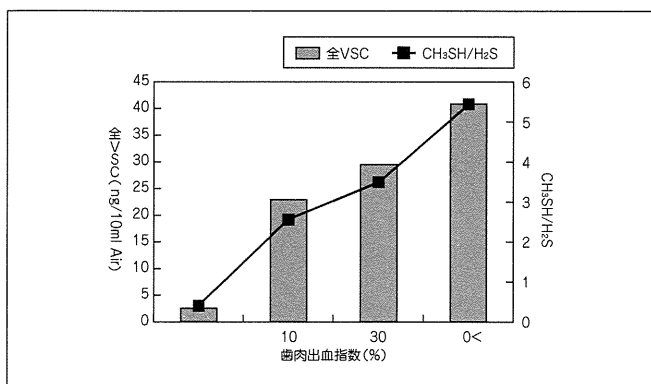


図17 歯肉出血指数とVSCs<sup>29)</sup>  
歯周炎が口臭増強の最大の因子で、その進行と共に口臭は強くなる。とくにCH<sub>3</sub>SHの比率が高まる。すなわち歯周炎予防が、最大の口臭予防処置である。これらの研究に対し「歯周病は関係しない」とのデータもある。これは高精度に口臭原因物質を測定するガスクロマトグラフィーを使わない実験であるための誤った評価である。

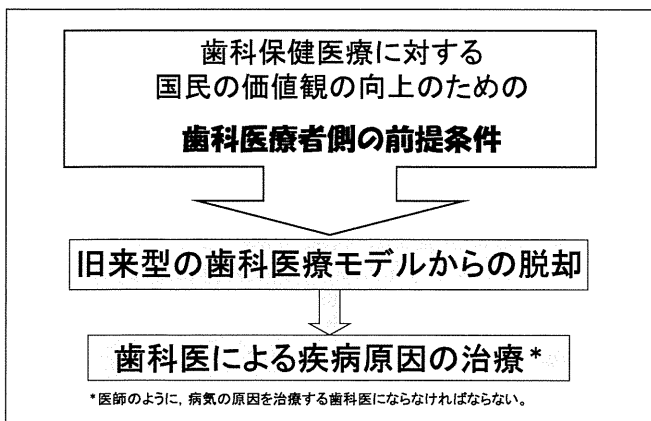


図18 「歯を削るのが歯医者の仕事」が一般の受け止め方である。医学的には、これはリハビリである。医者のように、病気の原因を治療する歯科医をめざすべきであろう。すなわち歯科疾患の原因となるバイオフィーム・歯石の処置である。

防が「歯科疾患の原因の治療」となる。図19のように、予防の成功には、セルフケア(歯磨きなど)、パブリックヘルスケアそしてプロフェッショナルケア(歯科医院における予防処置)の3因子が必須である<sup>13)</sup>。ところが日本は、この重要な仕事を国民自身(セルフケア)に任せてしまった。すなわち歯周病になれば、「歯磨きが悪いから」と歯科医師は患者に指摘する。これは方法を誤ると教師が学生に「勉強不足」を叱るのに似る。その結果、「歯磨きが上手であれば歯周病は、ほぼ完全に予防できる」との誤解さえ生んだ。そして「プロフェッショナルケア」は国民から忘れられた。

表7 地域住民が定期受診を受け入れる為に

**歯科界自身による一貫したポリシーの樹立\***：  
歯科保健医療に対する“国民の価値観向上”をめざした施策

**ターゲット**：学童および成人

**方策**：学童には、北米の方法に準じた保護者教育と学校でのヘルスプロモーション  
成人には口臭など口腔疾患の社会的・医学的為害性について認識を得る

**目標**：国民の公衆衛生の向上  
定期受診率の向上

\* 国や行政に期待できない時代になっている。国家施策が動くまで、歯科界は率先して社会・国民からの支持を得なければならない。第三者に期待する時代は終了した。

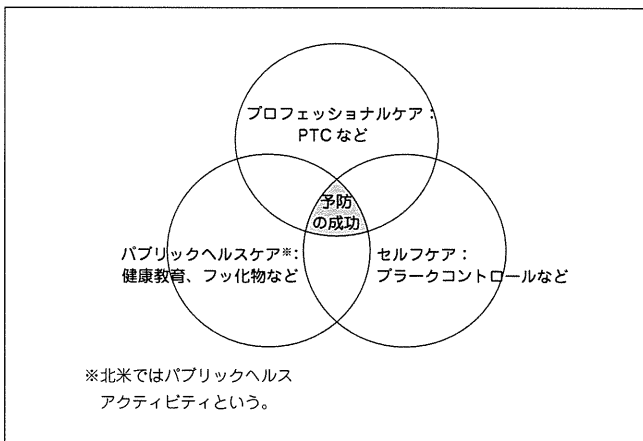


図19 予防の3つの輪<sup>13)</sup>  
予防の成功には、セルフケア(歯磨きなど)、パブリックヘルスケアそしてプロフェッショナルケアの3因子が必須である。ところが、「歯磨きが上手であれば(定期健診しなくても)歯科疾患は、ほぼ完全に予防できる」との国民的誤解を生んだ。

表8に示すように地域をパートナーとし、プロフェッショナルケアをプライオリティーにする臨床が必要になる<sup>63)</sup>。そうすれば、地域住民に長期間の健康が与えることができる。そして廻りまわって、開業医には医療収入と言う形で還元され、そして国民の公衆衛生・口腔保健をも大きく向上させる。そして、社会の理解を得ることもできる。多くの先進諸国あるいは隣国・韓国が成功し、中国の大都市が成功しつつあるように。

## 結論

1. 社会・国民の歯科保健医療への価値観向上が必須。
2. 「公衆衛生の向上・増進への貢献（歯科医師法第一条）」を根拠とした「上記1.」を目的とする活動が必要。
3. クリティカルシンキングを持って、社会の現状・歯科界を再分析すべき。
4. 「疾病原因の治療」（予防歯科臨床）を歯科医療の中心の一つとする。
5. 「口臭臨床」は以上の目的に、最も有効な手段の一つである。
6. 「口臭臨床」と同等あるいは、それ以上に有効でEBMある新たな手段の開発。

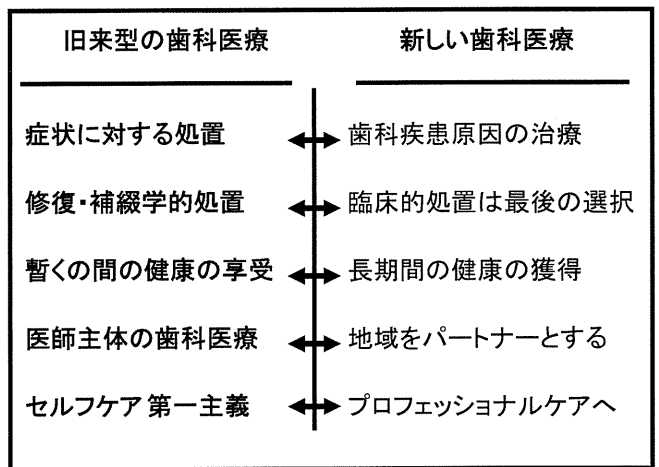
## 謝辞

多大な研究を行ってくれた日本歯科大学生命歯学部衛生学講座およびブリティッシュコロンビア大学八重垣研究室の各位に衷心より感謝する。論文作成に助言を頂いた本講座・今井敏夫准教授に深い謝意を表する。

### 【参考文献】

- 1) 松下幸之助, 未知は無限にある. PHP 研究所, 京都, 2007.
- 2) McGrath C, Bedi R. Dental services and perceived oral health: are patients better off going private? *Journal of Dentistry* 31: 217~221, 2003.
- 3) Sulser GF, Brening KH, Fosdick LS: Some conditions that affect the odor concentration of the breath. *J Dent Res* 18: 355~359, 1939.
- 4) 厚生省大臣官房統計情報部, 平成11年保健福祉動向調査, 厚生労働省, 東京, 2000.
- 5) 八重垣 健. 口臭はいかに健康な生活を損ねるか. *日歯医学会誌* 24: 12~16, 2005.
- 6) Yaegaki K. Oral malodorous compounds are periodontally pathogenic and carcinogenic. *Jpn Dent Sci Rev* 44: 100~108, 2008.

表8 歯科臨床体系の未来型転換<sup>50)</sup>



- 7) 八重垣 健. お口爽やかに, そして健康に. わかば出版, 東京, 2008.
- 8) 八重垣 健. 口臭臨床の実際: ヘルスプロモーションと口臭物質の病原性. *日歯会誌* 58: 27~38, 2005.
- 9) 八重垣 健, 鴨田剛司, 村田貴俊, 低濃度揮発性硫化物のヒトに与える影響について: in vitro 研究から. *臨床環境医学* 14: 99~105, 2005.
- 10) 八重垣 健. 口臭による歯周破壊・発癌性—人々の歯科定期受診啓発のために—. *歯科医療* 20: 61~78, 2006.
- 11) 八重垣 健, 今井敏夫. 歯髄・歯肉から臓器再生, 口臭毒性研究, ヘルスプロモーション研究, クリティカルシンキング研究. *歯学* 98 (秋季特別号): 84~96, 2010.
- 12) 八重垣 健, クリティカルシンキングのすすめ. クインテッセンス出版, 東京, 2009.
- 13) 八重垣 健. 診療室での予防プログラム—北米との比較から. *口腔衛生学* 2010 (松久保 隆, 八重垣 健, 前野正夫編), p314~320, 一世出版, 東京, 2010.
- 14) Kudrle RT, Meskin LH. Introduction in Reducing the cost of dental care, (editors Kudrle RT, Meskin LH.), Xiii~XXVii, The University of Minnesota Press, Minneapolis 1983.
- 15) Elderton RJ, Nuttall NM, Eddie S, Davies JA. Dental health services research in Scotland: a review of some 5-year results. *Community Dent Oral Epidemiol* 13: 249~252, 1985.
- 16) Sheiham A, Maizels J, Cushing A, Holmes J. Dental attendance and dental status. *Community Dent Oral Epidemiol* 13: 304~309, 1985.
- 17) Palmer C. ADA News, Americans recognize need for oral care, ADA-Crest/Oral B survey shows. *American Dental Association*. <http://www.ada.org/news/1708.aspx>, downloaded on June 10 2011.
- 18) 厚生省健康政策局歯科保健課, 昭和62年歯科疾患実態調査報告. 財団法人口腔保健協会, 東京, 1989.
- 19) 厚生省健康政策局歯科保健課, 平成5年歯科疾患実態調査報告. 財団法人口腔保健協会, 東京, 1995.
- 20) 厚生労働省医政局歯科保健課, 平成11年歯科疾患実態調査報告. 財団法人口腔保健協会, 東京, 2001.
- 21) 歯科疾患実態調査報告解析検討委員会, 平成17年歯科疾患実態調査報告. 財団法人口腔保健協会, 東京, 2007.
- 22) 八重垣 健. カナダ歯科界成功の理由 国民の歯科医療に対する価値観①. *DHstyle*, 1(9): 80~81, 2007.
- 23) 光安一夫. 定期的受診の奨め. *日本歯科大学校友会・歯学会会報* 36(4): 1, 2011.
- 24) 八重垣 健. 診療室での予防プログラム—北米との比較から. *口腔衛生学* (松久保 隆, 八重垣 健, 前野正夫編), p352~

- 358, 一世出版, 東京, 2009.
- 25) 八重垣 健, 病因論. 口腔衛生学2010 (松久保 隆, 八重垣 健, 前野正夫編), p160~171, 一世出版, 東京, 2010.
- 26) 八重垣 健, 増井和泉, 佐野祥平, 北村中也. 口臭に対する認識と行動について. 鶴見歯学 21 : 457~466, 1995.
- 27) 八重垣 健. カナダ歯科界成功の理由 国民の歯科医療に対する価値観②. DHstyle, 1 (0) : 80~81, 2007.
- 28) Ng W, Tonzetich J. Effect of hydrogen sulfide and methyl mercaptan on the permeability of oral mucosa. J Dent Res 63 : 994~997, 1984.
- 29) Ratkay LG, Waterfield JD, Tonzetich J. Stimulation of enzyme and cytokine production by methyl mercaptan in human gingival fibroblast and monocyte cell cultures. Arch Oral Biol 40 : 337~344, 1995.
- 30) Johnson PW, Ng W, Tonzetich J. Modulation of human gingival fibroblast cell metabolism by methyl mercaptan. J Periodontal Res 27 : 476~483, 1992.
- 31) Tonzetich J, Johnson PW. Radiochromatographic analysis of H<sub>2</sub>S-collagen complexes in rat-tail type I collagen. Arch Oral Bio 31 : 297~300, 1986.
- 32) Johnson PW, Tonzetich J. Sulfur uptake by type I collagen from methyl mercaptan/dimethyl disulfide air mixtures. J Dent Res 64 : 1361~1364, 1985.
- 33) Johnson PW, Tonzetich J, Pearce RH. Characterization of hydrogen sulphide reaction with rat-tail tendon type I collagen in vitro. J Periodontal Res 20 : 403~410, 1985.
- 34) Johnson PW, Yaegaki K, Tonzetich J. Effect of volatile thiol compounds on protein metabolism by human gingival fibroblasts. J. Periodontal. Res 27 : 553~561, 1992.
- 35) Johnson P, Yaegaki K, Tonzetich J. Effect of methyl mercaptan on synthesis and degradation of collagen. J Res 31 : 323~329, 1996.
- 36) Setoguchi T, Machigashira M, Yamamoto M, Yotsumoto Y, Yoshimori M, Izumi Y, Yaegaki K. The effects of methyl mercaptan on epithelial cell growth and proliferation. Int Dent J 52 : 241~246, 2002.
- 37) Yaegaki K, Qian W, Murata T, Imai T, Sato T, Tanaka T, Kamoda T. Oral Malodorous Compound Causes Apoptosis and Genomic DNA Damage in Human Gingival Fibroblasts. J Periodontal Res 43 : 391~399, 2008.
- 38) Irie K, Ekuni D, Yamamoto T, Morita M, Yaegaki K, Ii H, Imai T. One shot of hydrogen sulfide application induces a transient osteoclast differentiation with RANKL expression in the rat model. Arch Oral Biology 54 : 723~9, 2009.
- 39) Imai T, Ii T, Yaegaki K, Murata T, Sato T, Kamoda T. Oral malodorous compound inhibits osteoblast proliferation. J Periodontol 80 : 2028~2034, 2009.
- 40) Fujimura M, Calenic B, Yaegaki K, Murata T, Ii H, Imai T, Sato T, Izumi Y. Oral malodorous compound activates mitochondrial pathway inducing apoptosis in human gingival fibroblasts. Clin Oral Invest 14 : 367~373, 2010.
- 41) Calenic B, Yaegaki K, Murata T, Imai T, Aoyama I, Sato T, Ii H. Oral malodorous compound triggers mitochondrial-dependent apoptosis and causes genomic DNA damage in human gingival epithelial cells. J Periodont Res 45 : 31~37, 2010.
- 42) Yaegaki K. Oral Malodorous Compounds: Reasons of Periodontitis and Cancer. PROPHYLAXISdialogue 3 (Special Issue) : 22~25, 2009.
- 43) Calenic C, Yaegaki K, Kozhuharova A, Imai T. Oral Malodorous Compound Causes Oxidative Stress and p53-Mediated Programmed Cell Death in Keratinocyte Stem Cells. J Periodont. 81 : 1317~1323, 2010.
- 44) Ii H, Imai T, Yaegaki K, Irie K, Ekuni D, Morita M. Oral Malodorous Compound Induces Osteoclast Differentiation Without RANKL. J Periodontol 81 : 1691~1697, 2010.
- 45) Kobayashi C, Yaegaki K, Calenic B, Ishkitiev N, Imai T, Kobayashi H, Izumi Y, Haapasalo M. Hydrogen sulfide causes apoptosis in human pulp stem cells. J Endod, 37 : 479~484, 2011.
- 46) Ii H, Imai T, Calenic B, Yaegaki K, Irie K, Ekuni D, Morita G. Oral Malodorous Compound Induces Osteoclast Differentiation without RANKL. Journal of Dental Research 2010 ; 88Special Issue B : 4357.
- 47) Yaegaki K. Oral Malodor and Periodontal Disease in BAD BREATH; Research Perspectives (editor, Rosenberg, M. ), Ramot Publishing-Tel Aviv University, p87~108, 1995.
- 48) 八重垣 健. 口臭臨床の概略. クインテッセンス 20 : 553~557, 2001.
- 49) 八重垣 健. 口臭臨床の実際 ヘルスプロモーションと口臭物質の病原性. 日本歯科医師会雑誌 58 : 27~38, 2005.
- 50) 宮崎秀夫, 荒尾宗孝, 岡村和彦, 川口陽子, 豊福 明, 星佳芳, 八重垣 健. 口臭症の分類の試みとその治療必要性. 新潟歯会誌 29 : 11~15, 1999.
- 51) Yaegaki K, Coil J M, Kamemizu T, Miyazaki H. Tongue Brushing and Mouth Rinsing as Basic Treatment Measure for Halitosis. Int Dent J 52 : 192~196, 2002.
- 52) Yaegaki K, Coil M. J. Diagnosis and Treatment of Halitosis; Psychological Aspect of the Patients. J Can Dent Assoc 66 : 257~261, 2000.
- 53) Yaegaki K, Coil JM. Genuine Halitosis, Pseudo-Halitosis and Halitophobia: Classification, Diagnosis and Treatment, Compend Contin Educ Dent 21 (10A) : 880~890, 2000.
- 54) 八重垣 健, 口臭. 口腔衛生学2010 (松久保 隆, 八重垣 健, 前野正夫編), p150~159, 一世出版, 東京, 2010.
- 55) Fukui Y, Yaegaki K, Murata T, Sato T, Tanaka T, Imai T, Kamoda T, Herai M, Diurnal Changes in Oral Malodor among Dental-office Workers. Int Dent J 58 : 159~166, 2008.
- 56) Kleinberg I, Wolff MS, Codipilly DM. Role of saliva in oral dryness, oral feel and oral malodour. Int Dent J. 52 (Suppl 3) : 236~240, 2002.
- 57) Queiroz CS, Hayacibara MF, Tabchoury CP, Marcondes FK, Cury JA. Relationship between stressful situations, salivary flow rate and oral volatile sulfur-containing compounds. Eur J Oral Sci 110 : 337~340, 2002.
- 58) Tonzetich J, Preti G, Huggins GR. Changes in concentration of volatile sulphur compounds of mouth air during the menstrual cycle. J Int Med Res 6 : 245~254, 1978.
- 59) Yaegaki K, Sanada K. Volatile sulfur compounds in mouth air from clinically healthy subjects and patients with periodontal disease. J Periodontal Res 27 : 233~238, 1992.
- 60) Yaegaki K, Sanada K, Mirot F. L'halitose D'origine Buccale Etiologie. Diagnostic et Traitement, Journal de Parodontologie 12 : 27~33, 1992.
- 61) Yaegaki K, Sanada K. Biochemical and clinical factors influencing oral malodour in periodontal patients. J Periodontol 63 : 783~789, 1992.
- 62) Bosy A, Kulkarni GV, Rosenberg M, McCulloch CA. Relationship of oral malodor to periodontitis: evidence of independence in discrete subpopulations. J Periodontol 65 : 37~46, 1994.
- 63) アラン F. パターソン, 八重垣 健. HEALTH PROMOTION, オーラル・ヘルスプロモーションを成功させるために Part 2. 口腔衛生改善のための住民健康モデル. クインテッセンス 24 : 1938~1945, 2005.

論 説

## 科学論文とは

—若き研究者のための論文迅速評価法—

Donald M. BRUNETTE<sup>1,2)</sup> 八重垣 健<sup>2)</sup>

**概要：**論文を読むあるいは作成するための、論文の価値判断の指針を解説した。論文の構成要素には、まず「読者（あなた）」が最上位にあり、そしてタイトル・著者・掲載雑誌の位置づけ、要旨（抄録）、はじめに、研究方法と材料、結果、考察、結論などの因子がある。そのうえで、読者側からは「読者の印象に残る重要な情報」、そして「読者が個人的に学んだ明確で重要な情報」などの因子がある。読者は、その論文に、どの程度興味を持つことができるか、そして読む価値があるかを、判断しなければならない。そこで、要旨を注意深く読み、「読者が、論文を読む目的」を見つけることが必要となる。「タイトル・著者・掲載雑誌の位置づけ」では、論文に重要な新情報が記載されている可能性や、掲載雑誌のランクなどがわかる。要旨にはいくつかの構成要素があり、要旨を読み、「問題点や新知見」を見つけて論文を続けて読む理由とする。「はじめに」では、探求的で仮説に基づいた研究か否か判定し、研究方法と材料では、読者が実験結果の有効性を確かめ、実験を再現するのに十分な情報を得ることができる。結果では結論の基礎となるデータを十分に知り、考察では「論理のある確固とした結論」にしようとの著者の意図を知ることができる。一方、「はじめに」で記載された仮説の答えを「結論」で明確に知ることができる。

索引用語：科学論文、科学雑誌、インパクトファクター、歯科学、研究

口腔衛生会誌 61：536-543, 2011

(受付：平成 23 年 9 月 20 日／受理：平成 23 年 10 月 1 日)

### はじめに

歯科学の論文情報は、歯科関係英文誌の増加に伴い大きく増加した。さらに論文検索エンジンも日常的に利用され、処理すべき情報は随分多くなってきた。特に、目にした論文を読むべきかの価値判断や、読むポイントなど、若い研究者には難しいことも少なくない。そこで論文の価値判断の指針を若い研究者のために解説する。この指針は、論文の価値判断のみならず、科学的に価値ある論文を執筆するために使うことができる。

まず、論文を読む際の構成因子を解説する(図 1)<sup>\*1,1,2)</sup>。最初の因子として読者（あなた）が挙げられる。論文を読むには、読者が最重要因子である。著者ではない。次に、タイトル・著者・掲載雑誌の位置づけ、要旨（抄録）、はじめに、研究方法と材料、結果、考察、結論などの因子となる。そして、読者側からは、「印象に残る重要な情報」が論文を読むための大きな要因となる。読者個人と

して、何を「重要な事象」として学んだか明確にする必要性も出てくる。論文側の因子について、読者は何をすべきか？ その概要を図 2 に示した。これらに従い、それぞれの因子について以下に解説する。

### 読者（あなた）

読者（あなた）自身が、その論文に対し、どの程度興味があり、そして読む価値を認めるか判断しなければならない。まず、要旨を注意深く読み「読者にとって、その論文を読む目的は何か」を見極める必要がある。また、論文価値の判断のため「論文を読む理由・価値」を見つけなければならない。そのための具体的方法を、以下に列挙する。

1) 読者は、その論文を理解するに必要な知識を持っていること。あるいは、すでにどこまで知っている内容かを確認する。

2) 要旨の結論を「正しい」として受け入れるには、

<sup>1)</sup> Department of Oral Biological and Medical Sciences, Faculty of Dentistry, University of British Columbia

<sup>2)</sup> 日本歯科大学生命歯学部衛生学講座

\*1 Brunette DM: Critical Evaluator, [http://www.dmbu.net/Critical\\_Evaluator/h/index2.html](http://www.dmbu.net/Critical_Evaluator/h/index2.html) (2011 年 9 月 11 日アクセス)。

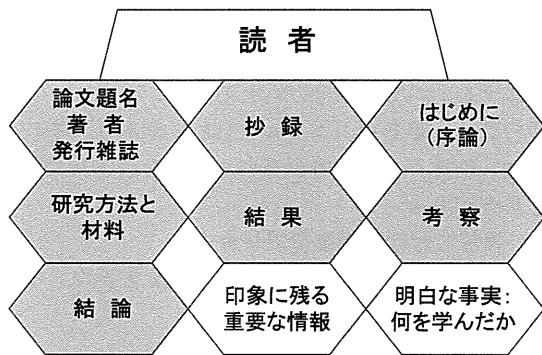


図1 理論的な論文アプローチ法

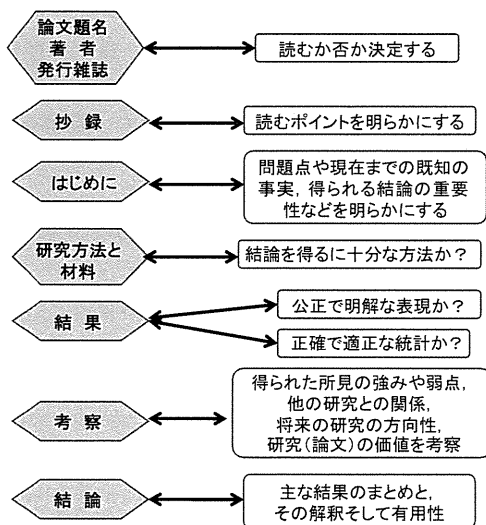


図2 論文側の因子について読者が行うべきこと, あるいは著者が著すべきことの概略

あるいは読者が結論を納得するには、どの程度の説得力（証拠）が論文に必要なかを考える。さらに、そのトピックについて一般的な関心はどの程度あるかを知ること、論文価値の評価に関わる。

3) その論文は、読者の将来の臨床あるいは研究に影響を与えるか判断する。

4) 判断基準として FISHER'S ASSERTABILITY QUESTION（明確性のための質問）を用い、「どの証拠から、結果や結論が真実と言えるか」、これを明らかにする。その結果、著者主体の論旨を、読者主体に変えることができる。

5) 以上から、読者が「その論文を読んで、分析するに値するクオリティーがあるか」を判断する。「ある」と思えば、論文を順序よく読んで分析することになる。

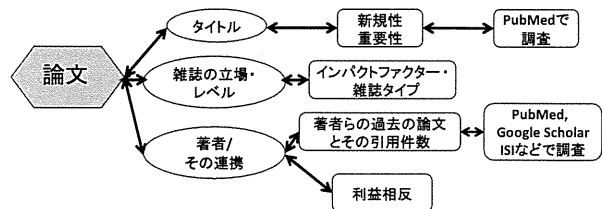


図3 タイトル、著者そして雑誌の位置づけで知るべき事実と、その調査法の概略（本文参照）

### タイトル、著者そして雑誌の位置づけ

ここでの目標は、「その論文には、新しく重要な情報が記載されているかを明確にする」ことにある。言い換えれば「その論文を読むべきか否か」の判断をする。「タイトル、著者そして雑誌の位置づけ」で知るべき事実と、その調査法の概略を図3に示し、以下に解説する。

#### 1. タイトル

その研究に新しく独創性があるかは、似た論文をPubMedで探して判断する。論文のトピックが重要かはタイトルで判断できる。また、結果やコンセプトあるいは方法論に新しい事実を含むかも、タイトルからチェックできることが少なくない。以上より、論文が重要な研究かどうか判断できる（重要というのは一般的な重要性と、読者個人にとっての重要性がある）。次に、結論がタイトルで理解できれば、将来の臨床あるいは研究に影響を与えるか判断する。さらに、十分な新しい情報量があるか判断できれば価値判断の大きな参考になる。また、その研究がなぜ行われたのか理由がわかると、良い判断材料となる。

#### 2. 著者

著者が、同じ分野で同じ研究を続け、論文公表を続けているかPubMedで調べる（北米では、研究者は研究テーマの連続性が重要視され、不連続な研究は信用度が低い）。この場合の著者はCorrespondence Author（連絡先の著者）や筆頭著者などで調べる。

また、著者の過去の論文が、他の論文でどの程度引用されているかを、Google Scholar（英語版）、可能ならばThomson ReutersのThe Institute for Scientific Information (ISI)のホームページで調べる。これらの結果から著者のこれまでの研究がある程度評価できる。また、研究に利益相反があるか否かも重要であり、これは謝辞などで判断できる。たとえばスポンサーのついた研究は代表的な利益相反である。

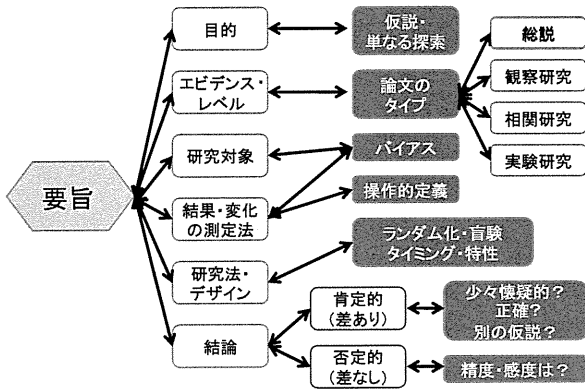


図4 要旨の構成と評価内容の概略 (本文参照)

### 3. 雑誌の位置づけ

著者の目標は、出版された後、多くの読者に読んでもらうことにある。そのため著者たちはインパクトファクターの高い雑誌を目指すことになる。そこで、まず学術誌か否か、査読がある雑誌か否かを知ったうえで、雑誌の信用性・置かれた地位を、インパクトファクターなどで判断する。ましてや、歯科企業等が出版している販売促進誌であれば、その位置づけは非常にあやしい。その雑誌が、論文トピックに相応の読者を対象にしているかも判断材料になる。公表時期やトピックが、時代に即したものであるかどうか、さらにそのトピックが続いて論文発表されているかどうかは、トピックの価値を知る材料になる（だからといって、全く新しい研究の価値を否定するものではない）。

また引用の有無や回数も重要である。たとえば、その論文が1年以上経過し、良い論文であれば、すでにどこかで引用されているはずである。すなわち、ここではインパクトファクターや引用件数で価値判断を行う。しかし、インパクトファクターが高いからといって、良い論文とは限らない。インパクトファクターがトップクラスの雑誌の論文が、数回しか引用されないことも少なくない。逆に、インパクトファクターが低い雑誌に掲載された論文でも数百回引用されることもある。

### 「要旨」

要旨の構成と評価内容の概略を図4に示した。要旨を読めば、論文を続けて積極的に読むために必要な問題点、あるいは新知見を見つけることができる。また、著者の論理を受け入れるだけの読み方ではなく、読者自身の視点で積極的に文献を読めば読者側の新しい論点を見出すこともできる。要旨でよく発生する問題として、

「重要情報を省略する（例：研究の規模（n数）や統計学的有意差の無視）」と、「著者とは異なる論理を考慮せず記載する」の2点が挙げられる。

要旨では、著者側のゴール（目的）があり、それを読者が知ったうえで、読者自身のゴールを設定して要旨を読む必要がある。

#### 1. 要旨における著者のゴール

- a) 研究目的、方法、結果そして結論を要約しながらも、その重要性を最大限に表現する。
- b) 論文から独立しており、本文を読まなくても理解ができるように記載する。
- c) 論文本文の情報のみ記載する。

#### 2. 要旨における読者のゴール

読む価値があるかどうか判断する。論文に興味をわき、その結論が正しいか否か知りたいとき、続けて論文を読むことになる。続けて読むポイント・論題を以下のように見つける。

- a) 目的は明確か？
- b) どのような研究戦略・デザインか？（観察研究、相関性研究、実験的研究？）
- c) 長所・短所を見極め、それらが研究にどう影響しているか？
- d) 研究デザインを判断する（特にデザインがない Naturalistic enquiry, 症例対照研究, randomized controlled trial, その他）。
- e) 対象選択、測定法、結果の判定、あるいは結果の理解などで、結論に影響を与えるバイアスがあるか否か？（後述）
- f) 結果は“肯定的”か“否定的”か？（実験群と対照群に差があるか否か？）
  - “肯定的”ならば（統計学的に有意差があれば）、その結果を説明する新たな仮説が考慮されているか？
  - “否定的”ならば（有意な差がなければ）、実験の検出感度は十分か？ 統計手法に誤りはあるか？あるいは Size Effect はどの程度か？（実験群と対照群に大きな差があっても n 数が少なければ有意差は出ないことがある。あるいはその逆もある。これを Size Effect という。Effect Size = 平均値の差/標準偏差として数値化もできる。標準偏差は対照群か実験群のいずれか、あるいは両者合計の標準偏差を用いる。しかし実際は対照群の標準偏差を用いるのが普通である。）
- g) 統計学的検定に説得力があるか？
- h) 実験方法が通法に従った論文であれば、最大の弱点はどれか？
- i) 新しい実験方法であれば、十分に説明・検証され

ている方法か？

j) 結論で将来の研究の可能性を示唆しているか？

k) 論文内容は FISCHER'S ASSERTABILITY QUESTION (前述) に答えているか？ あるいは、この研究領域のスタンダードに、論文内容がマッチしているか？

l) 結果・結論は新しく、そして重要な真の情報か？

m) 結論の正確性に影響する因子・問題を特定しているか？

## 「はじめに」

### 1. 著者のゴール

著者の目的は、読者の関心を引き付け論文を読ませることにある。それには、その分野の現在の全般的状況と研究の背景、すなわち研究分野の全体的把握が必要となる。また、バランスを保つために(後述)、研究にプラスだけでなくマイナスにもなる引用論文の記載が必要である。もちろん「はじめに」では、その研究の仮説もしくは課題を明確に示す。さらに、読者を「論文を読む方向」に向けさせることが必要である。そのために、a) 無関係な情報を含まない、b) 論文テーマに興味を持つ読者をターゲットにする、c) 早い段階でその研究における一般的な問題を提示しておく、d) 非常に強い文章で論文の重要性を強調する、ことが重要である。

### 2. 読者のゴール

読者が「はじめに」を読む際には、以下の疑問を持つべきである。

a) 論理的フレームワークはバランスがあって、レトリックがあるか？ バランスあるフレームワークとは、その研究分野を全般的に示すように論文を引用することである。言い換えるなら、過去のデータや論文で、その論文とは異なる考えがあったとしても、それらを除外せず含めることになる。

b) 探求的で仮説に基づいた研究か？

c) 仮説にいたる疑問点が明確になっているか？

d) その仮説は最初の疑問の答えとなっているか？

e) 疑問点は新しいものか？

f) あるいは、その研究結果は過去の報告を追認するだけになってはいないか？

## 「研究方法と材料」

読者が実験結果の有効性を確かめ、さらに実験を再現するために十分な情報を記載するのが目的である。したがって著者は、研究デザインが正しいことを証明しながら、実験再現のための情報を記述しなければならない。その一方で、用いた実験方法の限界を明らかにすること

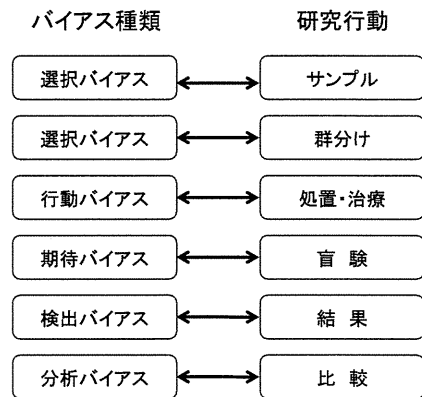


図5 研究行動とバイアス

も必要となる。たとえば、明確に検出限界を示すこともあれば、定量実験か定性実験か、あるいは半定量かを述べたり、有効数字で限界を示すなど数々の方法がある。「研究方法と材料」は結論に直接つながるので、読者はその限界レベルを理解しなければならない(上記以外にも、たとえば相関でp値だけでデータ価値を判断し、決定係数( $r^2$ )を無視する論文も少なくない。これは研究結果の限界を知るには必須である)。以下に、「研究方法と材料」でチェックすべき事項を列挙する。

a) 定義と分類：言葉が正確に使われているか？ 論文中で基準となっている定義は正しいか？

b) 研究デザインは妥当か？ 実験対象の群分けが正確に適切に行われているか？

c) データの有効性への影響因子のチェック。読者が要約を読み、有効性に悪影響を与える因子を見つけたら、論文本文を読む際、十分に気を付ける。しかし、そのような因子でも、結論にほとんど影響を与えず重要でない因子もあるのでよく見極める。

d) 適切な測定：単位の選択(絶対値と比あるいは指数など)、緻密さ、精度、有効性、信頼度、そして有効数字で、ある程度判断できる。

e) 臨床研究・疫学研究では、どのように対象者・症例を集めたか、バイアスはないかが要注意となる。

f) 実験研究では、その実験モデルを用いた理由を知り、その結果が臨床に影響するか、あるいは何らかの病態、病理、生理、生化学的機序の解明に寄与するかを検討する。

g) バイアスはないか？ これは最大の注意を払うべき因子である。そこで、各研究行動において発生するバイアスの種類を図5に示した。

h) 適切な統計が行われているかを判断する(後述)。



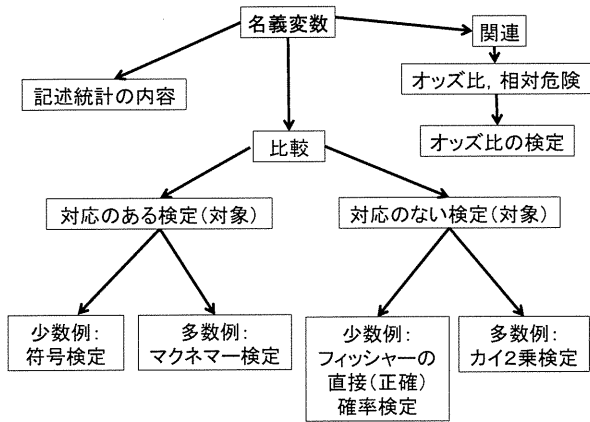


図6 名義変数 (順序のない変数, nominal data) の統計方法  
記述統計 (description, あるいは differences in properties), 比較 (comparison), 関連 (association) の大きく3種類に分けることができる。

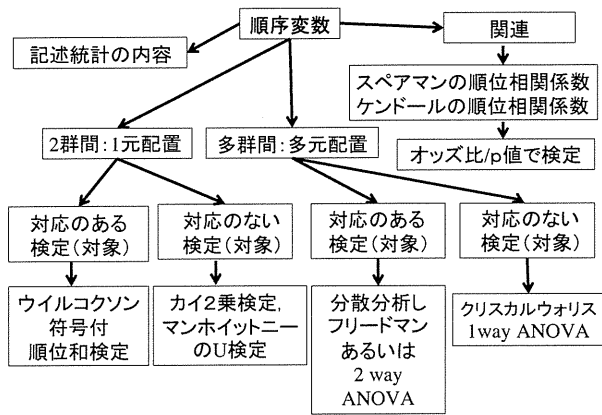


図7 順序変数 (ordinal data) の統計方法  
記述統計 (description), 比較 (comparison), 関連 (association, 多くは相関) の大きく3種類に分けることができる。

統計を行う際, よく行われるミスを Greenhalgh<sup>3)</sup> は下記のように指摘している。

- すべてのデータをコンピューターに入力し,  $p < 0.05$  の有意差があるものだけを報告する。
- 介入研究の際, サンプル集団のベースラインが良い結果を導きやすい場合は修正が必要となるが, 修正していない。
- 正規分布を検定していない。
- 研究途中で脱落した被験者や, コンセントフォームのない非承諾者を実験対象者に加えている。
- 因果関係を証明するためには, 有意な相関を得ねばな

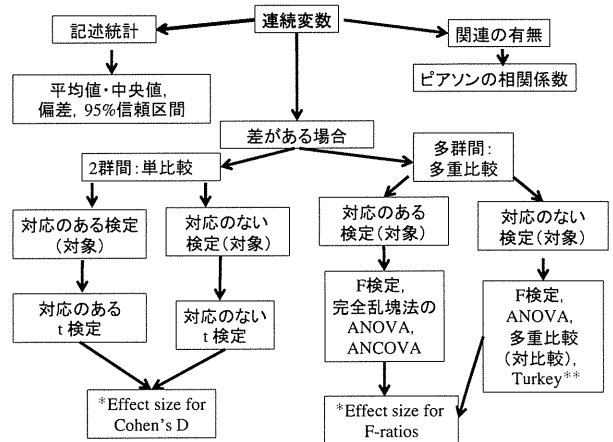


図8 連続変数 (continuous data) の統計方法  
記述統計 (description), 比較 (comparison), 関連 (association, 多くは相関) の大きく3種類に分けることができる。  
\*本文の「要旨」を参照。  
\*\* Tukey は「テューキー」あるいは「ターキー」と日本語で記載されている。Tukey はアメリカ人統計学者の名であるが, 米語ではテューキーとは発音せず, ターキーに近い。正確にはトアキーに聞こえる。

- らない。そこで, 相関するデータばかりを入力する。
- 良い結果を得るため, 異常値を使う。また不都合なデータを除き, 役立つデータを残す。
  - 「効果なし」の結果を含む信頼区間を無視し排除する。信頼区間には母集団があると考えられる。
  - 結果が有意になった時点で, 研究を終わる。
  - 結果が悪いとき, 良い結果が得られるよう subgroup を探す (群分けして統計にかけたグループをさらに群分けすること)。
  - 期待した結果が得られないとき, 他の統計法を行う。(Greenhalgh<sup>3)</sup> は1997年から近年まで, 論文の書き方などについて60編ほどBMJに公表しているので参考になる。)

適切な統計方法の使い方を, 名義変数・独立・従属変数のタイプ別に示す。図6に名義変数 (順序のない変数), 図7に順序変数, 図8には連続変数の統計方法をチャートで示した。それぞれ, 記述統計 (description), 比較 (comparison), 関連 (association, 多くは相関) の大きく3種類に分けることができる<sup>\*1,1,2)</sup>。

### 「結果」

結果での著者のゴールは, 読者が結果の妥当性を判断できるように, 説得力を持ってデータを明確に客観的に示

すことにある。また読者は、結論の基礎となるデータが十分な内容かを判断する。また著者の結論とは違う結論を、同じデータから考えることが必要な場合もある。これらに必要なチェック項目を列挙する。

- a) 図や写真の質は十分である（文献<sup>\*1</sup>を参照）。
- b) データがきれいに整理されている。
- c) 体系化されたデータを示している。
- d) 本文を適切に図・表に関連させている。
- e) その研究から得られたデータのみを報告している。
- f) 結果を説明するために過去形動詞を使っている。
- g) 結果と「研究方法」が関連している。
- h) その研究には再現性があると考えられる。
- i) 結果内でお互いに整合性がある。すなわち「つじつまが合う」あるいは、異なる図表のデータ間に矛盾がない。

j) 独立した実験の回数が十分である（独立した実験とは、たとえば3匹の実験動物を使い、同じ生化学検査を各動物について3回行った場合、 $n=9$ ではなく、それぞれ3回の平均値で統計を行い $n=3$ となる）。

k) 既報の研究で似たデータが発表されている場合、どこが新しいのか判断する（前述のように、近年簡易なコンピューター検索が普及しながらも、昔の研究論文が無視されることが多くなった。論文査読者でさえ検索不十分なことが少なくない。「研究の最前線をつかむには過去5年の論文で十分」との考えがあるためであろう。論文を理解するには古い研究を検索する必要性も出てくる）。

l) Effect size（＝平均値の差/標準偏差）を検討している（前述）。

m) 結果に統計学的有意性がある。

n) データ処理過程でどのデータが失われたかを知る。

o) 結果の表や図で、データが不規則に提示されていないか？たとえば、グラフで一種のトリックを使い、データの差を大きく見せることがある。CLEVELAND'S HIERARCHY<sup>\*1,1)</sup>では、読者が数量的な順序を知るのに必要な視覚表現をHIERARCHYを使い順番を付けている（図9）。「同じスケール上で差を示す」のがHIERARCHYのトップで、次に、別のスケール上で差を示す、長さ、角度/スロープ、面積、量、そして色調・密度の順になる。したがって、意図的にこれを操作すれば読者は「より差があるか」のように誤解させることができる。ほかにも、「ベースラインを下げる」、「効果の実際の程度を偽る」などがある。また図表表現で著者が新しい変わった手法を取っていれば、不確実な結果を良く見せるテクニックではないかチェックする。

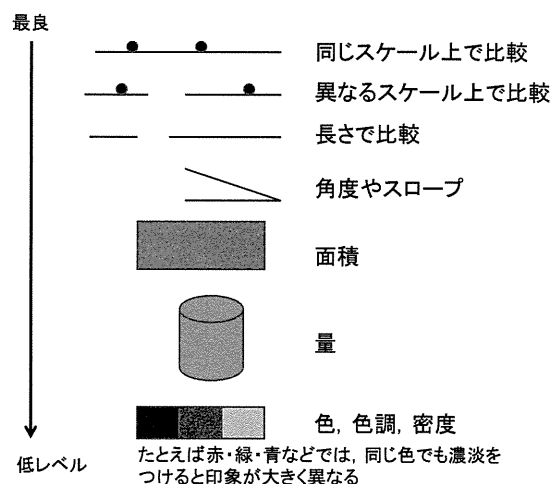


図9 Cleveland's Hierarchy：数量的な順序を示す視覚効果の比較

最も正確に表すのが、「同じスケール上での比較」で、最低は「色、色調、密度」となる。これを意図的に使えば、差が少ない結果を大きな差があるように読者は錯覚する。

### 「考察」

著者は、研究結果を読者に納得させるため、結論を論理のある確固としたものとする。すなわち科学論文では、「著者の結論」を信じさせる記載が必要である。そのためには、真実を求める真摯な議論に基づいて論文が構成されなければならない。

著者が、考察で記載すべきは以下のとおりである。

- a) 「結論、比較、意味・重要性、示唆、推測、応用、将来の研究、種々の結果、その実験の限界」について討論する。
- b) 「はじめに」で提示された疑問・課題に答え、そして、研究結果に関連する考察ポイントを明らかにする。
- c) 研究内容を明確にするため、考察のすべてを費やす。
- d) 結論あるいは、その証拠の信頼限界について考察する。
- e) 他の結論やデータと不一致とならないようにする。
- f) マイナーな事象・事実などはマイナーなままにする。
- g) 推測と意見を区別する。
- h) 証拠から論理構成し、論理の源を明らかにする。
- i) 結論・結果に関連性のある有効な証拠すべてを考察する。
- j) 有効な論理だけ記載し誤りをなくす。

k) 無意味な、あるいは的が外れた証拠を除外し、後付けの証拠・論理がないようにする。

l) リンゴとオレンジを比較するような、本当の結論が見つからない論理を避ける。

m) UFO 論議をしない（不適切な二者択一を示している；UFO 論議では「異星人の操る UFO は存在するの否かの二者択一」が議論的であり、たとえば「地球から UFO あるいは UFO に見えるもの」が現れるとの第 3 の選択肢はない）。

n) 最後は、弱い表現で終わるのではなく、強く訴えるように終わる。

o) 帰納法や演繹法を正しく使う<sup>1,2)</sup>。

読者は、上記項目のチェックに加え、a) 議論の前提が正しいこと（隠されている前提条件に注意する）、b) 議論が正しい流れであること、c) それぞれの議論でそれぞれの疑問が明確に示されていること、d) すべての重要な情報について文献を引用していること、e) 記載のほとんどがレトリック（修辞法）であれば、論理に反する部分を最小限にし、肯定的な結果を過度に強調していないか？ f) 論理構成に際し、確証バイアスがないか？ つまり論理に一致する情報を好んで探していないか、以上のチェックが必要である。

### 「結論」

結論に記載すべき事象を概略する。結論は証拠と論理に基づいて証明されなければならない。すなわち読者が「結論の真実性」を納得する証拠を示し、結論はきちんとしたすべての証拠に基づかなければならない。証拠もバイアスなく選び、結論に反する既報のデータも含めて正しい説明を加える必要がある。「適正な論理 + 正しい前提 = 確固たる結論」という公式が結論にあてはまるよう構成する。また議論関連図（議論の材料となる各因子を関連付けた図）により、結論と論文記載の種々の事実・証拠との関連を明示できなければならない。またデータに裏打ちされていない結論を記載してはならない。さらに「はじめに」に記述された「最初の仮説ある

いは疑問」に、結論は明確に答える必要がある。

### 読者の印象に残る重要な情報

著者の結論と一致する情報が、読者にとってまず重要な情報となる。次に、研究の欠落部分を説明するために結論を修正する必要があるれば、読者自身で修正する。また論文の“致命的に見える欠陥”があれば、読者は「著者の結論」を完全に拒否することもできる。しかし論文を緻密に読めば、読者は何かの結論を得られるはずである。そして将来の研究に参考になる結論を記録する。すなわち印象に残る重要な情報を記録する。

### 明白な事実：何を学んだか？

肯定的内容（すなわち有意差のある結果）、確固とした結論、新しく優れた方法論、今まで知らなかった引用文献、統計学的手法、説得力ある修辞法、エビデンスレベルの指標、将来の研究の役に立つアイデア等を見つける。そして、これらを将来のために記録する。

### 謝 辞

資料収集に協力いただいた戸来真由美、伊井久貴両博士に謝意を表す。

### 文 献

- 1) Brunette DM editor: Critical Thinking understanding and evaluating dental research, Quintessence Publishing, Chicago, 2nd ed., 2007, pp. 1-114, 133-244.
- 2) 八重垣 健, 佐々木啓一, Brunette DM, 安彦善裕ほか共著: 実践 クリティカルシンキングの薦め, クインテッセンス出版, 東京, 2009, 1-85 頁.
- 3) Greenhalgh T: How to read a paper. Statistics for the non-statistician. II: "Significant" relations and their pitfalls. BMJ 315: 422-425, 1997.

著者への連絡先：八重垣 健 〒102-8159 東京都千代田区富士見 1-9-20 日本歯科大学生命歯学部衛生学講座  
TEL：03-3261-8791 FAX：03-3261-8796  
E-mail：yaegaki-k@tky.ndu.ac.jp

## A Quick Evaluation Guide for Young Scientists

Donald M. BRUNETTE<sup>1,2)</sup> and Ken YAEGAKI<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Oral Biological and Medical Sciences, Faculty of Dentistry,  
University of British Columbia

<sup>2)</sup> Department of Oral Health, School of Life Dentistry, Nippon Dental University

**Abstract:** Evaluating a scientific paper entails several considerations and specific questions related to: YOU (the reader), Title/Author/Location, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusion as well as the “Take Home Message” and “Positives: “what did you learn”. YOU, needs to define specific personal selection criteria. The Abstract/Summary needs to identify issues of possible concern and an agenda of active reading. Questions under Title/Author/Location, assess the quality of the journal, and the track record of the authors. In the Introduction, the reader looks for a balanced framework of problem statements, the approach and whether the questions being asked relate directly to the hypothesis. Materials and Methods are designed to help the reader judge the validity of the results and whether the investigation could be repeated. In the Results section, readers need to judge the strength of the data underlying the conclusions. Scientific papers attempt to convince a reader into accepting the conclusions. The Conclusions should answer or at least make relevant points about the questions posed in the Introduction. The “Take-Home Message” is a statement in the readers own words of their own conclusions about the paper, and “Positives:” is what the reader actually learned. Recording the “Take-Home-Message” and the “Positives” enable the reader to rapidly review knowledge acquired from his/her reading.

J Dent Hlth 61: 536-543, 2011

**Key words:** Scientific paper, Scientific journal, Impact factor, Dentistry, Research

**Reprint requests** to K. YAEGAKI, Department of Oral Health, School of Life Dentistry, Nippon Dental University, 1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159, Japan

TEL: 03-3261-8791/FAX: 03-3261-8796/E-mail: yaegaki-k@tky.ndu.ac.jp

# Effects of a composition containing lactoferrin and lactoperoxidase on oral malodor and salivary bacteria: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled clinical trial

Kouichirou Shin · Ken Yaegaki · Takatoshi Murata · Hisataka Ii · Tomoko Tanaka · Izumi Aoyama · Koji Yamauchi · Tomohiro Toida · Keiji Iwatsuki

Received: 27 January 2010 / Accepted: 26 April 2010 / Published online: 29 May 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** We report a clinical trial of the effects of test tablets containing bovine lactoferrin and lactoperoxidase on oral malodor and salivary bacteria. Fifteen subjects with volatile sulfur compounds (VSCs) in mouth air above the olfactory threshold ( $\text{H}_2\text{S} > 1.5$  or  $\text{CH}_3\text{SH} > 0.5$  ng/10 ml) as detected by gas chromatography were enrolled in the trial. Either a test or a placebo tablet was ingested twice at 1-h intervals in two crossover phases. Mouth air was monitored for VSC levels at the baseline before ingestion of a tablet, 10 min after the first ingestion, 1 h (just before the second ingestion), and 2 h after the first ingestion. Whole saliva was analyzed at the baseline and at 2 h for bacterial numbers. At 10 min, the level of  $\text{CH}_3\text{SH}$  was significantly lower in the test group (median [interquartile range]=0.28 [0.00–0.68]ng/10 ml) compared to that in the placebo group (0.73 [0.47–1.00]ng/10 ml;  $P=0.011$ ). The median concentration of  $\text{CH}_3\text{SH}$  in the test group was below the olfactory threshold after 10 min until 2 h, whereas the level in the placebo group was above the threshold during the experimental period. No difference in the numbers of salivary bacteria was detected by culturing or quantitative PCR, but terminal restriction fragment length polymorphism detected one fragment with a significantly lower

copy number at 2 h in the test group (mean  $\pm$  standard error,  $4.89 \pm 0.11 \log_{10}$  copies/10  $\mu\text{l}$ ) compared to that in the placebo group ( $5.38 \pm 0.15 \log_{10}$  copies/10  $\mu\text{l}$ ;  $P=0.033$ ). These results indicate a suppressive effect of the test composition on oral malodor and suggest an influence on oral bacteria.

**Keywords** Lactoferrin · Lactoperoxidase · Oral malodor · Salivary bacteria · Clinical trial

## Introduction

Oral malodor affects up to one half of the general population and has become of great concern to many people in the past few decades [1, 2]. The putrefactive action of microorganisms producing volatile sulfur compounds (VSCs) against proteinaceous components in tongue coating, saliva, and gingival crevicular fluid is generally agreed to be responsible for oral malodor [2–4]. Tongue cleaning is very effective in reducing oral malodor, and antimicrobial products in the form of mouthwashes or dentifrices have also been reported to be effective [2, 4–6]. However, antimicrobial compounds like chlorhexidine cause some side effects [2, 7]. Zinc mouthwash, which is one of the most effective products, causes an uncomfortable bitter taste [2, 8].

Biological procedures for reducing oral malodor may involve fewer side effects and are environmentally safe. Lactoferrin (LF), a member of the transferrin family and a component of milk, saliva, tears, and secondary neutrophil granules, exhibits antimicrobial activity [9]. LF has a wide range of biological functions other than antimicrobial

K. Shin · K. Yamauchi · T. Toida · K. Iwatsuki  
Food Science & Technology Institute,  
Morinaga Milk Industry Co., Ltd.,  
5-1-83 Higashihara,  
Zama, 228-8583 Kanagawa, Japan

K. Yaegaki (✉) · T. Murata · H. Ii · T. Tanaka · I. Aoyama  
Department of Oral Health, Nippon Dental University,  
1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku,  
Tokyo 102-8159, Japan  
e-mail: yaegaki-k@tky.ndu.ac.jp

activities, such as demonstrating immuno-modulatory effects and regulating both cell proliferation and iron uptake [9, 10]. Lactoperoxidase (LPO), a member of the mammalian heme peroxidase family, is a component of milk, saliva, and other exocrine secretions [11]. In these secretions, LPO catalyzes the hydrogen peroxide-dependent oxidation of thiocyanate ( $\text{SCN}^-$ ) to hypothiocyanite ( $\text{OSCN}^-$ ), which is a potent antimicrobial agent against bacteria, fungi, and viruses [11]. LF and LPO, both known to be antimicrobial components in saliva, have been reported to inhibit the metabolism and growth of oral pathogens [12–14]. The inhibitory effects of LF on biofilm formation by periodontopathic bacteria have also been reported [15]. Oral administration of LF has been shown to reduce the number of periodontal pathogens in subgingival plaque [16]. Recently, a composition containing LPO, glucose oxidase (GO), glucose, and citrate buffer salts has been developed [17]. This composition showed bactericidal activity against oral bacteria in vitro in the presence of saliva or  $\text{SCN}^-$ . Tablets that slowly dissolve in saliva seem to be a possible candidate for an oral-hygiene product to introduce antimicrobial agents into the oral cavity effectively and to retain these agents transiently on the tongue surface to reduce oral malodor.

Therefore, combining LF and the above composition is of interest in assessing clinical efficacy in oral hygiene, especially against oral malodor mainly produced by oral pathogens [18]. The aim of this randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled clinical study was to assess the short-term effects of this composition containing LF and LPO on oral malodor and salivary bacteria.

## Materials and methods

### Composition of the test tablet

The compositions of the test and placebo tablets are presented in Table 1. LF purified from bovine milk (Morinaga Milk Industry, Tokyo, Japan), LPO purified from bovine milk (Biopole, Gembloux, Belgium), and GO originating from *Penicillium chrysogenum* (Sumizyme PGO, Shin-Nihon Chemical, Aichi, Japan) were used. The tablets (Morinaga Milk Industry) were round in shape with a 12-mm diameter and 6-mm thickness.

### Subjects

Fifteen healthy volunteers aged 26–54 years (mean age 30.3 years; 11 male, four female) were recruited. The volunteers had not received antibiotic therapy in the preceding 2 weeks, had no untreated carious lesions or periodontitis, and were found in screening examinations to

**Table 1** Compositions of the test and placebo tablets

Component	Amount per tablet (mg)	
	Test	Placebo
LF	100.0	–
LPO	1.8	–
GO	24.0	–
Glucose	27.0	–
Trisodium citrate dihydrate	31.2	–
Citric acid	14.1	–
Erythritol	270.0	–
Xylitol	67.5	–
Maltitol	323.9	754.8
Cornstarch	–	100.0
Coloring materials	–	4.7
Flavor	2.7	2.7
Menthol	1.8	1.8
Sucrose fatty acid ester	18.0	18.0
Glycerol fatty acid ester	18.0	18.0

The total weight of each tablet was 900 mg

have VSCs in mouth air above the olfactory threshold [hydrogen sulfide ( $\text{H}_2\text{S}$ ) >1.5 ng or methylmercaptan ( $\text{CH}_3\text{SH}$ ) >0.5 ng/10 ml air] using gas chromatography [19]. Cooperation with the trial was achieved by careful explanation of the procedures involved and clarification of the overall aims of the study. Written informed consent was obtained from all volunteers. The research protocol was reviewed and approved by the research ethics committee of Nippon Dental University.

### Study design

The present study was a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled clinical trial. The subjects were randomly assigned to one of two groups using a series of randomized numbers. In the first crossover phase, the subjects in one group ( $n=8$ ) ingested the test tablets and the subjects in the other group ( $n=7$ ) ingested the placebo tablets. There was a 1-week washout period between the two crossover phases. In the second crossover phase, each subject ingested the alternative tablets to the first phase.

### Oral malodor assessment

On the day of assessment, the subjects were asked to abstain from eating, drinking, and using oral-hygiene practices from midnight until the end of the experiment. The subjects ingested a test or placebo tablet twice in the morning at a 1-h interval. Foods, especially such a tiny tablet, could be expected to be used frequently because of

their convenience, so the current clinical trial was designed taking into consideration the usual procedure of ingesting a food tablet several times a day. Each tablet was sucked for 10 min and then chewed and swallowed if still remaining.

Van del Velde et al. [20] have reported that only VSCs among the 700 compounds in mouth air are significantly correlated with the strength of oral malodor, as Tonzetich suggested [19]. VSCs in two mouth-air samples were analyzed using a GC8A gas chromatograph equipped with a flame photometric detector (Shimadzu, Kyoto, Japan), as described previously [21], at the baseline before ingestion of a tablet, 10 min after the first ingestion, 1 h (just before the second ingestion), and 2 h after the first ingestion. The second ingestion occurred immediately following the mouth-air analysis at 1 h. To sample the mouth air, 20 cm of polytetrafluoroethylene sampling tube (3.3 mm outside diameter) connected to the inlet of a six-port valve with the 10-ml sample loop of the gas chromatograph was inserted into the center of the oral cavity through the lips and teeth, and the lips remained closed around it for 1 min. Fifteen milliliters of mouth air was aspirated with a gas-tight syringe connected to the outlet of the valve. The concentrations of H<sub>2</sub>S and CH<sub>3</sub>SH, the main components of oral-malodorous sulfur compounds, were determined in each sample. Total VSC concentration was obtained as the sum of the H<sub>2</sub>S and CH<sub>3</sub>SH concentrations. The average concentrations of H<sub>2</sub>S, CH<sub>3</sub>SH, and total VSCs at each time points were calculated and expressed as nanograms/10 ml as previously reported [21].

### Salivary bacteria assessment

Unstimulated whole saliva samples of approximately 2 ml were collected at the baseline (before starting the oral malodor assessment) and at 2 h (after finishing the oral malodor assessment). Each saliva sample was vortexed and a 0.5-ml portion stored at -20°C for later use in quantitative PCR. The remaining saliva sample was sampled with a culture swab (BD, Tokyo, Japan) for the determination of the number of lactobacilli, total streptococci, and mutans streptococci (*Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*), using selective plates of Rogosa SL agar (BD), Mitis–Salivarius agar (BD), or improved Mitis–Salivarius agar as previously described [22]. The number of bacteria was expressed as log<sub>10</sub> colony-forming units (CFU)/swab.

### Quantitative PCR

DNA was extracted from each saliva sample, and then quantitative PCR was performed using oligonucleotide primers and probes targeting the 16S rRNA of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, or total

bacteria as previously described [23]. The number of bacteria (the target DNA sequences) was expressed as log<sub>10</sub> copies/10 μl saliva.

### Terminal restriction fragment length polymorphism analysis

Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis was performed on the DNA extracted from the saliva sample [24]. Fragments of the bacterial 16S rRNA gene were amplified by PCR with the extracted DNA in the presence of 6-FAM labeled universal forward primer, D88 (5'-GAGAGTTTGTATYMTGGCTCAG-3'), and unlabeled universal reverse primer, E94 (5'-GAAGGAGGTGWTCCARCCGCA-3'). The PCR product was digested with *HaeIII* (Promega, Tokyo, Japan) and analyzed using the ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) with GeneScan 1200 LIZ (Applied Biosystems) as the internal size standard. The electropherograms were analyzed using GeneScan software (version 3.7, Applied Biosystems), and the fragment sizes in base and peak areas were estimated using the local Southern method. The copy number of each terminal-restriction fragment (T-RF) was calculated from the number of total bacteria obtained by quantitative PCR and the percentage of peak area for each fragment compared to total peak area. The number of bacteria (T-RFs) was expressed as log<sub>10</sub> copies/10 μl saliva. Phylogenetic analysis of the T-RFs generated with the above-mentioned primer pairs and restriction-enzyme digestion was performed on the basis of base size, with the help of the TRFMA database containing information on the nucleotide sequences of approximately 650 species of oral bacteria and their T-RFs [25].

### Statistical analysis

Data from the experiments with different tablets were separately calculated and expressed as median [lower quartile–upper quartile] or means ± standard error for each group ( $n=15$ ). Normal distribution was not found in the concentrations of VSCs at baseline than their medians for each group. Thus, the intra-group differences in the concentrations of VSC during the experimental period were analyzed using the Friedman test. The differences in the concentrations of VSCs and number of bacteria between baseline and each time point in each group were analyzed using the Wilcoxon signed rank test. The differences in the concentrations of VSCs and number of bacteria between the test and placebo groups at each time point were analyzed using the Wilcoxon test. The detection limit of the quantitative PCR or T-RFLP result was 1.00 or 4.75 log<sub>10</sub> copies/10 μl for the statistical analysis. Values of  $P<0.05$  were accepted as significant. Statistical analysis was performed using the software program JMP (version 5,

SAS Institute Japan, Tokyo, Japan) or KaleidaGraph (version 3.6, Hulinks, Tokyo, Japan).

## Results

### Concentration of H<sub>2</sub>S in the mouth air

Changes in the concentration of H<sub>2</sub>S in the mouth air are shown in Fig. 1a. Significant intra-group differences over the duration of the experimental period were detected in both groups. Compared to the baseline, the concentration of H<sub>2</sub>S was significantly lower in both groups at 10 min, 1 h, and 2 h. The median concentration of H<sub>2</sub>S in the test group was below the olfactory threshold level (1.5 ng/10 ml) at 2 h, whereas the concentrations in the placebo group were over the threshold level during the entire experimental period.

### Concentration of CH<sub>3</sub>SH in the mouth air

Changes in the concentration of CH<sub>3</sub>SH in the mouth air are shown in Fig. 1b. Significant intra-group differences over the duration of the experimental period were detected in both groups. Compared to the baseline, the concentration of CH<sub>3</sub>SH was significantly lower in both groups at 10 min, 1 h, and 2 h. The concentration of CH<sub>3</sub>SH in the test group (0.28 [0.00–0.68]ng/10 ml) was significantly lower at

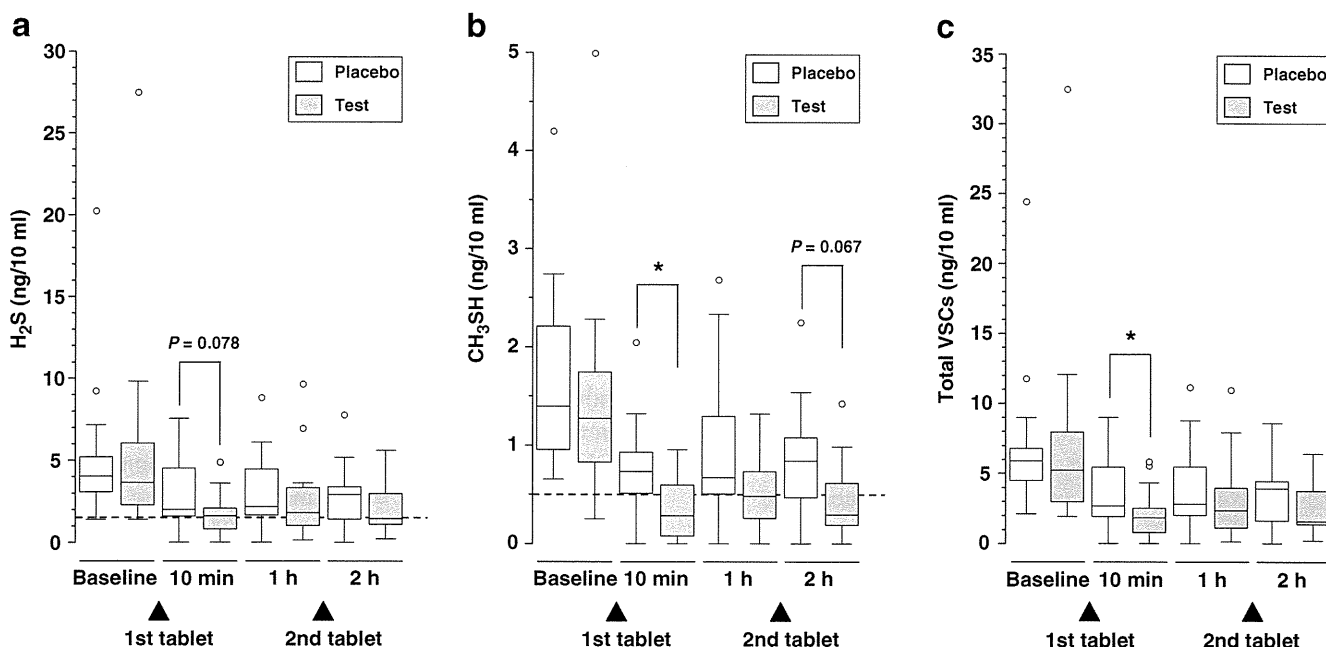
10 min compared to that in the placebo group (0.73 [0.47–1.00]ng/10 ml;  $P=0.011$ ). The median concentration of CH<sub>3</sub>SH in the test group was below the olfactory threshold level (0.5 ng/10 ml) after 10 min until 2 h, whereas the concentration in the placebo group was above the threshold level during the entire experimental period.

### Concentration of total VSCs in the mouth air

Changes in the concentration of total VSCs in the mouth air are shown in Fig. 1c. Significant intra-group differences in the total VSC concentration over the duration of the experimental period were detected in both groups. Compared to the concentrations of VSCs at the baseline, the concentration was significantly lower in both groups at 10 min, 1 h, and 2 h. The concentration of total VSCs in the test group (1.85 [0.79–2.75]ng/10 ml) was significantly lower at 10 min compared to that in the placebo group (2.70 [1.93–6.37]ng/10 ml;  $P=0.049$ ).

### Number of salivary bacteria

The number of salivary bacteria determined by culturing and quantitative PCR is shown in Table 2. No significant difference was detected in the number of bacteria for each of the species between baseline and 2 h in each group or between the two groups at each time point.



**Fig. 1** The effects of ingesting test tablets on the concentrations of VSCs in mouth air. **a** H<sub>2</sub>S, **b** CH<sub>3</sub>SH, **c** total VSCs. Data are expressed as sample minimum (lower edge of whisker), lower quartile (lower edge of box), median (traverse line in box), upper quartile (upper edge of box), sample maximum (lower edge of whisker), and outlier

(circles) in box-and-whisker plots. The olfactory thresholds of H<sub>2</sub>S (1.5 ng/10 ml) and CH<sub>3</sub>SH (0.5 ng/10 ml) are shown in broken lines. The time points of tablet ingestion are indicated by closed triangles. \* $P<0.05$  between the test and placebo groups



**Table 2** Salivary bacteria analyzed by culturing and quantitative PCR

Bacteria	Group	Baseline	2 h
Culturing		Number of bacteria (log <sub>10</sub> CFU/swab)	
Lactobacilli	Placebo	2.76±0.06	2.74±0.04
	Test	2.77±0.05	2.75±0.04
Total streptococci	Placebo	5.75±0.22	5.53±0.20
	Test	5.79±0.25	5.78±0.21
Mutans streptococci	Placebo	2.97±0.15	2.84±0.09
	Test	2.86±0.09	2.84±0.09
Quantitative PCR		Number of bacteria (log <sub>10</sub> CFU/10 μl)	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Placebo	1.11±0.08	1.16±0.10
	Test	1.10±0.07	1.16±0.12
<i>P. gingivalis</i>	Placebo	1.49±0.27	1.57±0.31
	Test	1.47±0.25	1.52±0.28
<i>P. intermedia</i>	Placebo	1.65±0.28	1.61±0.25
	Test	1.72±0.30	1.64±0.27
<i>F. nucleatum</i>	Placebo	5.13±0.28	5.06±0.27
	Test	4.96±0.35	4.92±0.28
Total bacteria	Placebo	7.46±0.18	7.31±0.15
	Test	7.38±0.22	7.25±0.17

Data are expressed as mean ± standard error. The detection limit of the quantitative PCR was 1.00 log<sub>10</sub> copies/10 μl for the statistical analysis

T-RFLP analysis detected an average of 39 T-RFs in the saliva samples. Table 3 summarizes the 15 T-RFs; a significant difference was detected between baseline and 2 h for each group, and between the two groups at each time point. The test and placebo groups showed 11 (162, 203, 249, 257, 294, 306, 320, 323, 329, 574, and 915 bases) and four (262, 302, 913, and 915 bases) fragments, respectively, with significantly reduced copy numbers at 2 h compared to those at the baseline. These fragments were not assigned to specific bacterial species. The T-RF 265 bases in length had a significantly lower copy number at 2 h in the test group (4.89±0.11 log<sub>10</sub> copies/10 μl) compared to that of the placebo group (5.38±0.15 log<sub>10</sub> copies/10 μl;  $P=0.033$ ). This fragment was assigned to bacterial species belonging to *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Eubacterium*, *Clostridiales*, *Bacteroidales*, and *Desulfomicrobium* [24, 25].

## Discussion

LF and LPO are known to be constituents of both mammalian milk and saliva [9–11]. These components in saliva and gingival crevicular fluid may contribute to the oral health status [16, 17, 26–29]. However, this is the first study of the clinical efficacy against oral malodor of a composition containing LF and LPO. Using foods for controlling oral malodor provides many benefits besides fewer side effects. Although oral-hygiene products always require a special place for their use, e.g., a bathroom or washbasin, foods such as a tablet can easily be used

anywhere and conveniently taken without unnecessary disposal after ingestion.

The results of the current clinical trial indicate short-term suppressive effects of the test composition on oral malodor. We designed this study employing 15 subjects because the suppressive effects of other foods or oral hygiene products on oral malodor were successfully demonstrated with a similar number of subjects [21]. The subjects were randomly assigned to one of two groups in each crossover phase; moreover, no statistical difference in their VSC levels at baseline was observed between the test and placebo groups. In controlling oral malodor, the test tablet may be more effective than previously examined food products on the market, including mint tablets, parsley-seed oil capsules, and sugarless chewing gum [21]. These results demonstrate that the test tablet might be a new measure for suppression of oral malodor in addition to the currently existing treatment measures such as tongue brushing, mouth rinsing, etc. [1, 2, 4].

In the present study, the extent of oral malodor reduction by the tablets was also evaluated by comparing the concentration of VSCs in the mouth air of the subjects to the olfactory threshold of VSCs [19]. The olfactory thresholds of CH<sub>3</sub>SH and H<sub>2</sub>S are above 0.5 and 1.5 ng/10 ml mouth air, respectively. The median concentration of CH<sub>3</sub>SH in the test group was below the objectionable concentration (olfactory threshold) of CH<sub>3</sub>SH after 10 min until 2 h, whereas the concentration in the placebo group was above the objectionable concentration during the entire experimental period. The median concentration of H<sub>2</sub>S in the test group was below the olfactory threshold at 2 h,

**Table 3** Salivary bacteria analyzed by T-RFLP

Fragment size (bases)	Group	Number of fragments (log <sub>10</sub> copies/10 μl)		TRFMA database assignments
		Baseline	2 h	
162	Placebo	5.30±0.20	5.06±0.16	Not identified
	Test	5.40±0.16	5.16±0.13*	
203	Placebo	6.50±0.15	6.32±0.09	<i>Myxococcus coralloides</i> <i>Desulfobulbus</i> sp. oral clone CH031 <i>Coralloccoccus exiguous</i> <i>Coralloccoccus</i> sp. SDU-2
	Test	6.44±0.20	6.25±0.16*	
249	Placebo	5.16±0.16	5.08±0.13	Not identified
	Test	5.36±0.17	5.12±0.14*	
257	Placebo	5.10±0.11	4.97±0.10	<i>Bifidobacterium</i> sp. oral strain A32ED <i>Leptotrichia</i> sp. oral clone EI022
	Test	5.15±0.12	4.96±0.11*	
262	Placebo	6.29±0.25	6.02±0.22*	<i>Flavobacterium</i> -like sp. oral clone AZ105 <i>Bifidobacterium</i> sp. oral strain H6-M4 <i>Bacteroides</i> cf. <i>forisythus</i> oral clone BU063 <i>Prevotella</i> sp. oral clone DO045 TM7 phylum sp. oral clone FR058
	Test	6.32±0.28	6.14±0.22	
265	Placebo	5.08±0.08	5.38±0.15	<i>Prevotella</i> spp. (10 phylotypes) <i>Porphyromonas</i> -like sp. oral clone DA065 <i>Streptococcus mitis</i> <i>Treponema</i> spp. (5 phylotypes) <i>Prevotella loescheii</i> <i>Eubacterium</i> sp. oral clone BU014 <i>Clostridiales</i> bacterium oral clone P4PA_66 P1 <i>Bacteroidales</i> oral clone MCE7_20 <i>Bacteroides</i> -like sp. oral clone X083 <i>Prevotella dentalis</i> <i>Desulfomicrobium orale</i> <i>Streptococcus</i> sp. oral clone FP064
	Test	5.03±0.14	4.89±0.11**	
294	Placebo	5.31±0.20	5.29±0.19	<i>Oscillatoria corallinae</i> <i>Sphingomonas</i> sp. oral clone AW030 <i>Spiroplasma litorale</i>
	Test	5.45±0.18	5.27±0.15*	
302	Placebo	5.00±0.09	4.87±0.08*	<i>Firmicutes</i> spp. (2 phylotypes) <i>Eubacterium saburreum</i> <i>Eubacterium saburreum</i> -like sp. oral clone CK004 <i>Peptostreptococcus</i> spp. (2 phylotypes) <i>Eubacterium</i> spp. (4 phylotypes) Human oral bacterium C73 <i>Lachnospiraceae</i> oral clone MCE9_104 <i>Streptococcus mitis</i>
	Test	4.98±0.08	4.96±0.09	
306	Placebo	6.54±0.20	6.29±0.19	<i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus</i> spp. (8 phylotypes) <i>Streptococcus oralis</i> <i>Streptococcus cristatus</i> <i>Streptococcus sanguinis</i>
	Test	6.52±0.23	6.12±0.25*	
320	Placebo	5.37±0.17	5.32±0.13	<i>Streptococcus gordonii</i> <i>Streptococcus intermedius</i> <i>Streptococcus constellatus</i> <i>Streptococcus mutans</i>
	Test	5.48±0.15	5.18±0.15*	

**Table 3** (continued)

Fragment size (bases)	Group	Number of fragments ( $\log_{10}$ copies/10 $\mu$ l)		TRFMA database assignments
		Baseline	2 h	
				<i>Firmicutes</i> oral clone CH017
				<i>Filifactor alocis</i>
				<i>Clostridiales</i> spp. (2 phylotypes)
323	Placebo	5.36 $\pm$ 0.18	5.20 $\pm$ 0.15	Not identified
	Test	5.51 $\pm$ 0.13	5.26 $\pm$ 0.12*	
329	Placebo	5.31 $\pm$ 0.21	5.19 $\pm$ 0.15	<i>Flexibacter litoralis</i>
	Test	5.33 $\pm$ 0.18	5.14 $\pm$ 0.14*	
574	Placebo	5.63 $\pm$ 0.22	5.50 $\pm$ 0.15	<i>Bacteroidales</i> oral clone MCE7_120
	Test	5.50 $\pm$ 0.18	5.21 $\pm$ 0.15*	<i>Porphyromonas</i> -like sp. oral clone DA064
913	Placebo	5.28 $\pm$ 0.16	5.06 $\pm$ 0.12*	<i>Tannerella forsythensis</i>
	Test	5.12 $\pm$ 0.14	5.00 $\pm$ 0.11	
915	Placebo	5.16 $\pm$ 0.13	4.88 $\pm$ 0.09*	<i>Tannerella forsythensis</i>
	Test	5.08 $\pm$ 0.10	4.81 $\pm$ 0.05*	<i>Bacteroidetes</i> sp. oral clone FX069
				<i>Bacteroides</i> -like sp. oral clone AU126
				<i>Porphyromonas</i> sp. oral clone HF001

T-RFs with significant intra- or inter-group differences are listed. Data are expressed as mean  $\log_{10}$  copies/10  $\mu$ l  $\pm$  standard error. The detection limit was 4.75  $\log_{10}$  copies/10  $\mu$ l for the statistical analysis.

\* $P$ <0.05 between baseline and 2 h; \*\* $P$ <0.05 between the test and placebo groups

whereas the concentration in the placebo group was above the threshold level during the entire experimental period. In previous reports, the  $H_2S$  concentration of 1.5 ng/10 ml was still at a detectable but not objectionable level, and that of 2.5 ng/10 ml was at a slightly objectionable level [18, 19, 30]. Our results indicate that the median concentrations of  $H_2S$  in the test group after 10 min until 2 h were not objectionable, whereas the concentration in the placebo group increased to the objectionable concentration at 2 h. The actual numbers of subjects who showed the lower concentration than the olfactory threshold in the test and placebo groups were 2 and 0 at baseline, 10 and 4 at 10 min, 8 and 4 at 1 h, and 8 and 5 at 2 h, respectively in  $CH_3SH$  concentration, and 1 and 1 at baseline, 7 and 3 at 10 min, 7 and 3 at 1 h, and 8 and 4 at 2 h, respectively in  $H_2S$ , although any statistical difference between the test and placebo groups was not found in both  $CH_3SH$  and  $H_2S$  by  $\chi^2$  test.

The suppressive effect of the test tablet on the concentration of VSCs in the mouth air was more clearly observed in the levels of  $CH_3SH$  compared to the levels of  $H_2S$ . The odor of  $CH_3SH$  has been found to be more objectionable with a lower threshold of objectionability compared to  $H_2S$  [19]. Anaerobic periodontopathic bacteria have been implicated in the production of VSCs, especially  $CH_3SH$ , in the oral cavity [31–33]. LF and LPO have an inhibitory effect on several species of periodontopathic bacteria in vitro [14, 15, 17, 34]. The suppressive effect of LF on the number of periodontopathic bacteria in the subgingival plaque was also demonstrated [16]. The in vitro

experiments based on the method previously described by Shin et al. [17] showed that the test tablet reduced the number of oral bacteria such as *A. actinomycetemcomitans* by more than 4 log units after incubation for 5 min in the presence of  $SCN^-$  at a physiological concentration in saliva, whereas the placebo tablet exhibited no bactericidal activity (data not shown). It is likely that the ingestion of the test tablet suppressed metabolic activity or the living number of periodontopathic bacteria residing in the oral microbial community (microflora). LF and LPO have also been shown to inhibit acid production and the uptake of amino acids or other nutrients [12, 13, 35]. In the metabolic pathway that produces VSCs, the uptake of amino acids or peptides is an essential step in utilizing sulfur-containing substrates [2, 3, 36, 37]. LF and LPO inhibit the activity of protease, which is a key enzyme in the degradation of high molecular weight proteins into low molecular weight peptides that provide substrates for VSC production [38, 39].

T-RFLP has been applied to the analysis of microflora profiles in oral and extra-oral specimens from humans [24, 40–43]. T-RFLP is a rapid and effective molecular method for analyzing the profile of microflora in oral specimens, as information on the constituents of oral microflora has been accumulated by sequencing the clone library of bacterial 16S rRNA [44–46] and a useful database has been established from the genetic information [25]. We improved the T-RFLP profiling reported by Takeshita et al. [24], i.e., we used the new internal size standard GeneScan 1200 LIZ to improve the accuracies of the standard peaks. The base

size of each T-RF was estimated and searched for in the TRFMA database, which contains information of the theoretical T-RFs of oral bacteria using the same primer sets and restriction enzymes as those used in the current study. Because the total bacterial numbers obtained by quantitative PCR analysis were diverse among saliva samples, the copy numbers of T-RFs estimated from the percentage area of the fragments and the copy numbers of total bacteria obtained from the analysis of 16S rRNA were compared. In the T-RFLP analysis of the present study, the 265-base T-RF had a significantly lower copy number at 2 h in the test group compared to the placebo group. This fragment was assigned to bacterial species belonging to *Prevotella*, *Porphyromonas*, and *Treponema*, which demonstrate the ability to produce VSCs both in vitro and in vivo [31–33, 36, 37]. These results suggest that the ingestion of a test tablet influenced the number of oral bacteria, especially VSC-producing microorganisms, although neither culturing nor quantitative PCR results could demonstrate the effects of the test tablet on the number of oral pathogenic bacteria in saliva.

In this study, the placebo tablet showed some suppression of VSC production, although to an extent less than that of the test tablet. Since fatty acid esters of sucrose and glycerol, which were added as lubricants to the tablets, are known to have the properties of detergents with bacteriostatic activity [47, 48], the suppressive effect of the placebo tablet on oral malodor may be due to the actions of these components. Trisodium citrate dihydrate and citric acid were added as buffer salts to the test tablet to make the solvent a slightly acidic condition, which itself does not influence the number of living bacteria in vitro but provide LPO with optimal condition for showing its antibacterial activity [17]. There were also differences in the contents of sugar and sugar alcohols between the test and placebo tablets. Glucose was added in the test tablet as a substrate for GO. The test tablet contains erythritol, xylitol, and maltitol at lower percentage of total sugar alcohols compared to the placebo tablet, which contains maltitol only. These sugar alcohols are not utilized by mutans streptococci and classified as non-cariogenic [49]. Furthermore, sugar alcohols, such as xylitol and maltitol, added to chewing gum were demonstrated not to affect the production of VSCs in vivo [21].

In conclusion, the results of this clinical study indicate short-term effects on oral malodor when ingesting a test tablet containing LF and LPO. As antimicrobial effects of the tablet were found in vivo, further clinical studies for a longer experimental period of several months should be conducted to demonstrate the long-term effects of the test tablet.

**Conflict of interest statement** Four of the authors, K. Shin, K. Yamauchi, T. Toida, and K. Iwatsuki, are employees of Morinaga Milk Industry Co., Ltd. All other authors declare that they have no conflict of interest related to this study.

**Sources of funding** This study was supported by research grants from Morinaga Milk Industry Co., Ltd.

## References

1. Yaegaki K, Coil JM (2000) Examination, classification, and treatment of halitosis; clinical perspectives. *J Can Dent Assoc* 66:257–261
2. Loesche W, Kazor C (2002) Microbiology and treatment of halitosis. *Periodontology* 2000 28:256–279
3. Yaegaki K, Sanada K (1992) Biochemical and clinical factors influencing oral malodor in periodontal patients. *J Periodontol* 63:783–789
4. Scully C, Greenman J (2008) Halitosis (breath odor). *Periodontology* 2000 48:66–75
5. Roldan S, Winkel EG, Herrera D, Sanz M, Van Winkelhoff AJ (2003) 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* 30:427–434
6. Farrell S, Baker RA, Somogyi-Mann M, Witt JJ, Gerlach RW (2006) Oral malodor reduction by a combination of chemotherapeutic and mechanical treatments. *Clin Oral Invest* 10:157–163
7. Tilliss TS, Stach DJ, Cross-Poline GN (1992) Use of toothpicks for chlorhexidine staining. *J Clin Periodontol* 19:398–400
8. Young A, Jonski G, Rølla G (2003) Inhibition of orally produced volatile sulfur compounds by zinc, chlorhexidine or cetylpyridinium chloride—effect of concentration. *Eur J Oral Sci* 111:400–404
9. Lönnnerdal B, Iyer S (1995) Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr* 15:93–110
10. Wakabayashi H, Yamauchi K, Takase M (2006) Lactoferrin research, technology and applications. *Int Dairy J* 16:1241–1251
11. Thomas EL, Bozeman PM, Learn DB (1991) Lactoperoxidase: structure and catalytic properties. In: Everse J, Everse KE, Grisham MB (eds) *Peroxidases in chemistry and biology*, vol 1. CRC, Boca Raton, pp 123–142
12. Arnold RR, Russell JE, Champion WJ, Brewer M, Gauthier JJ (1982) Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infect Immun* 35:792–799
13. Thomas EL, Milligan TW, Joyner RE, Jefferson MM (1994) Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase–hydrogen peroxide–thiocyanate system against oral streptococci. *Infect Immun* 62:529–535
14. Ihalin R, Loimaranta V, Lenander-Lumikari M, Tenovuo J (2001) The sensitivity of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* to different (pseudo)halide–peroxidase combinations compared with mutans streptococci. *J Med Microbiol* 50:42–48
15. Wakabayashi H, Yamauchi K, Kobayashi T, Yaeshima T, Iwatsuki K, Yoshie H (2009) Inhibitory effects of lactoferrin on growth and biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3308–3316
16. Kondo I, Kobayashi T, Wakabayashi H, Yamauchi K, Iwatsuki K, Yoshie H (2008) Effects of oral administration of bovine lactoferrin on periodontitis patients. *Jpn J Conserv Dent* 51:281–291 (in Japanese)
17. Shin K, Horigome A, Wakabayashi H, Yamauchi K, Yaeshima T, Iwatsuki K (2008) In vitro and in vivo effects of a composition containing lactoperoxidase on oral bacteria and breath odor. *J Breath Res* 2:017014 (5 pp)
18. Awano S, Koshimune S, Kurihara E, Gohara K, Sakai A, Soh I, Hamasaki T, Ansai T, Takehara T (2004) The assessment of methyl mercaptan, an important clinical marker for the diagnosis of oral malodor. *J Dent* 32:555–559