

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11768

研究課題名(和文)国民に広く浸透する肺炎予防のオーラルバイオフィルムを除去する新しい方法の開発

研究課題名(英文)Development of widely use new method to eliminate oral biofilms to prevent pneumonia

研究代表者

河相 安彦(KAWAI, Yasuhiko)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：50221198

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文):義歯性口内炎などを引き起こすC. albicansに特異的な抗菌作用を示す唾液中の抗菌物質:β-defensin 3, histatin 5およびIgAの唾液中濃度の測定を行なった結果, IgAは午前中に低値となる日内変動を認めた。また, β-defensin 3, histatin 5およびIgAは日間変動を認めなかった。臨床試験にあたり, C. albicansに対する感染防御能を個人レベルで把握するためにはIgAが低値を示す午前中に唾液採取を行うことを実験条件とし, また測定は, histatin 5が経時的に真菌数が減少する傾向を示したことから, 試験開始直後の測定が必須であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は, 誤嚥性肺炎や, 義歯性口内炎を引き起こすC. albicansに対する個々の抗菌力の個人差について検討をした研究である。今回実施した基礎研究では, 人の唾液中に抗菌作用のある抗菌物質が存在し, 日中においてその抗菌効果が変動するものとそうでないものがあることが明らかとなった。この結果を応用して個人の抗菌力を測定することで, 個々の抗菌力の診断精度が向上し, 口腔のケア等の計画がオーダーメイド化につながる可能性があるものと考えられる。今後も, 検討を重ね, 超高齢社会に役立てていきたい。

研究成果の概要(英文): We measured salivary concentrations of β-defensin 3, histatin 5, and IgA, which have specific antibacterial activity against C. albicans, a cause of denture stomatitis, and IgA showed diurnal variation with low levels in the morning. The salivary concentrations of β-defensin 3, histatin 5, and IgA showed diurnal variation with low levels in the morning, while β-defensin 3, histatin 5, and IgA showed no diurnal variation. In the clinical trial, saliva samples were collected in the morning, when IgA levels were low, as an experimental condition to determine the individual level of infection protection against C. albicans. It was suggested that the measurement should be done immediately after the start of the test.

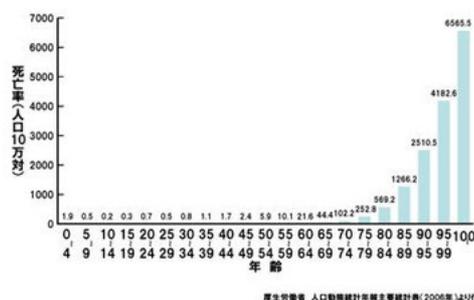
研究分野: 歯科補綴学

キーワード: C. albicans β-defensin 3 抗菌作用 histatin 5

1. 研究開始当初の背景

我が国に差し迫る超高齢化社会は、多くの国民が健康長寿を享受する社会を理想としているものの、要介護や独居老人の絶対数の増加も残念ながら見込まれていた。それに伴い、医療費の増加が大きな社会的課題となっていた。そこでいかに国民全体の健康長寿を底上げし、医療費を抑制するかは喫緊かつ重要な社会的課題であった。健康長寿の延伸には様々な要因が複合されて達成されるものであり、その一つとして消化器官の入り口である「口腔の健康管理」が注目を集めた。口腔の管理不足と高齢者における肺炎の発症が疑われていたからであった。そこで歯科的な治療介入による口腔器官の健康維持は重要であり、なかでも、口腔細菌が外界の環境変化に応じて集団でつくる様々な構造体が歯垢となり、義歯に付着するプラークとなるのがバイオフィームであり、高齢者に高頻度の誤嚥性肺炎や、様々な感染症の一要因とされており (Abe et al, Arch Gerontol Geriatr 2006, Scannapieco, J Am Dent Assoc 2006, Mojon et al, Gerodontology 1997) バイオフィームの日々の除去、殊に患者自身による日々の除去が重要であるとされていた (J Am Dent Association 2011)。特に、免疫機構の低下した、要介護または独居高齢および有病者における口腔バイオフィームの除去による口腔細菌叢増殖の抑制は、国民全体の健康長寿を底上げにつながる観点から重要な事項であった。高齢者の多くが装着している義歯に形成されるバイオフィームは、従来から機械的清掃と化学的清掃が基本とされていた。しかしながら、この方法は自身のケアを十分行うことが困難な要介護や独居老人には、十分な対応が困難で、より一般の国民へ広く浸透する、新たなバイオフィームの除去法の開発が求められていた。

肺炎の年齢階級別死亡率



2. 研究の目的

口腔細菌が外界の環境変化に応じて集団でつくる構造体、すなわち口腔および補綴装置、特に有床義歯に付着するバイオフィームは肺炎を起こす原因の一つとされている。一方、要介護高齢者は自身による口腔ケアが困難で、バイオフィームの除去は介護者などの介入が必須である。本研究の目的は、介護者、家族などが簡便で低コストで行える費用対効果の高い義歯の清掃法を探索し、要介護高齢者の口腔環境の改善による感染症の予防、ひいては国民の健康長寿と医療費の抑制につなげることを目的とした。そして、「バイオフィームを如何に除去するか」から「バイオフィームを如何に付着させないか」に視点を変えることと、個体の持つ抗菌力 (特に唾液成分の抗菌力) にも着目して、明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

唾液中には非特異的あるいは特異的に微生物に対して、静菌的、殺菌的に作用する複数の抗菌物質が含まれており、その中には *C. albicans* に特異的な抗菌作用を示す β -defensin 3 および histatin 5 や *C. albicans* を含む微生物の口腔粘膜への定着を阻止する IgA などがある。そこで本研究は、これらの唾液中の抗菌物質濃度を測定することによって *C. albicans* に対する感染防御能を個人レベルで把握することが可能であると推察し、唾液資料を用いた検査への応用について検討を試みた。まず着目した唾液中抗菌物質の中で IgA は日内変動が存在していることは知られているが、*C. albicans* に対して強い抗菌作用を有する β -defensin 3 および histatin 5 の日内変動については未だ不明である。そのため、唾液採集の至適時間に関する示唆を得ることを目的とし、3つの抗菌物質の変動を検討した (研究1)。さらに、唾液中抗菌物質濃度の *C. albicans* に対する抗菌作用および反応時間をヒトが有する濃度レベルで検討した報告はない。これらを明らかにすることで、*C. albicans* に対する感染リスクの指標に関する示唆を得ることを目的とし、抗菌物質の濃度別における抗菌作用および反応時間を検討した。

研究は2段階に分けて行った。最初の研究は、 β -defensin 3, histatin 5 および IgA の日内および日間の影響を明らかにするために健康者 20 名 (男性 10 名, 女性 10 名, 平均年齢 25.7 \pm 1.95 歳) を対象に行われた。本研究は松戸歯学部倫理委員会の承認のもと被験者の同意を得て行った。同意を得られた被験者より 1日2回、連続7日間の安静時唾液を採取し、上記の抗菌物質濃度を ELISA 法にて測定した。 β -defensin 3, histatin 5 および IgA における日内変動および日間変動を Two-way ANOVA を用いて検討した。

次に、ヒト唾液中抗菌物質濃度の濃度別における *C. albicans* に対する抗菌効果を明らかにする目的で、研究1から得られた被験者の抗菌物質濃度を参考に、最大濃度、中央濃度および

最小濃度の3種類の濃度を決定した。それに基づき詳細が明らかになっていない β -defensin 3およびhistatin 5の濃度別における*C. albicans*に対する抗菌効果について検討した。

実験方法は、吸光度値およびコロニー数より作成された検量線を参考に、菌数調整 (1.0×10^8 および 1.0×10^5 CFU/ml) された菌培養液 (ベースラインおよびコントロール, 以下BLおよびCONT) を用意した。そして、研究1より得られた結果より各唾液中抗菌物質 (最大濃度・中央濃度・最小濃度) [β -defensin 3 (233.8・24.3・2.4 ng/ml), histatin 5 (114.1・12.3・1.1 μ g/ml)] をそれぞれ recombinant mouse beta-defensin 3 protein (R&Dsystems, MN, USA) そして histatin 5 (PEPTIDE INSTITUTE, Osaka, Japan) を上記濃度に希釈して使用した。菌培養液に各抗菌物質を混合し、37°C下、好機条件下にて静置培養した。測定項目は① 10倍希釈法による真菌数、②真菌が保有する菌活動量の指標であるATP活性値および③*C. albicans*の各唾液中抗菌物質に対する感受性を検討するために、ディスク拡散法を用いて24時間、48時間培養後に形成された阻止円の有無を判定した。真菌数およびATP活性値はBL時、混和した直後(0h)、混和後0.5h、1h、2h、3h、4h、5hおよび6h経過後に測定を行った。6時間経過時の真菌数およびATP活性値の比較をKruskal-wallis検定を行い、その後の検定としてBonferroni法を用いて検定した。生菌評価における確証を得る目的で真菌数およびATP活性値との関連を検討するためPearsonの相関係数を用いた。

4. 研究成果

最初の研究より、IgA (図1C) の値は午前中の値が午後と比較して有意に低い値を示した ($p = 0.002$)。一方、 β -defensin 3 (図1A) およびhistatin 5 (図1B) は有意な差を認めなかった ($p=0.58$ および $p=0.70$, 図1)。

続いて行われた検討から、真菌数の経時的な変化において β -defensin 3は経時的に真菌数が増加する傾向を示す ($p=0.051$) 一方で、histatin 5は経時的に真菌数が減少する傾向を示した ($p=0.017$)。Bonferroni法の結果、最大濃度のhistatin 5とコントロールの間に6時間経過時の真菌数の比較において有意な差を認めた ($p=0.017$)。

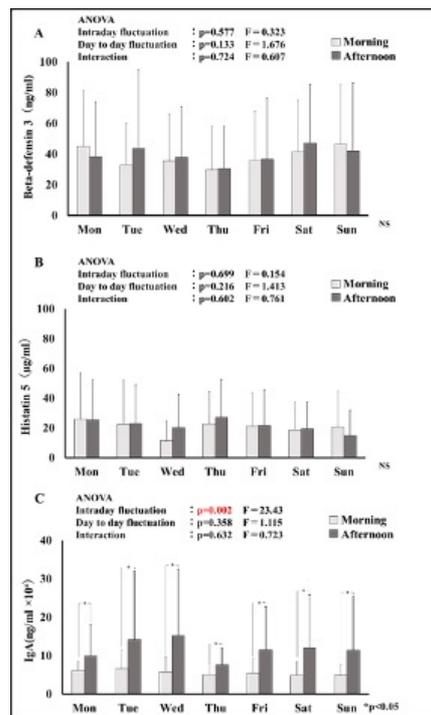
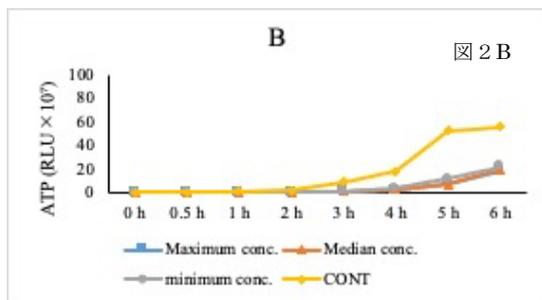
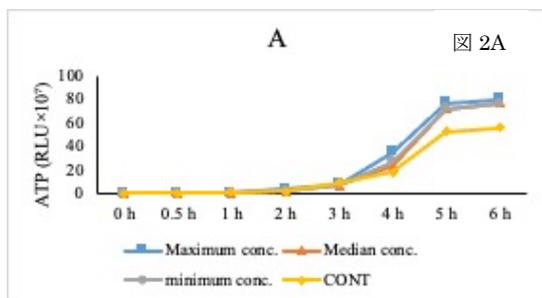


図1

ATP活性値の経時的な変化において β -defensin 3は経時的にATP活性値が増加する傾向を示す ($p=0.050$, 図2A) 一方で、histatin 5は経時的にATP活性値が減少する傾向を示した ($p=0.051$, 図2B)。

β -defensin 3濃度の違いにおける真菌数とATP活性値との相関係数は最大濃度 1.000 ($p < 0.0001$), 中央濃度 1.000

($p < 0.0001$), 最小濃度 0.998 ($p < 0.0001$) となり、正の相関を示した。Histatin 5濃度の違いにおける真菌数とATP活性値との相関係数は最大濃度 0.913 ($p = 0.002$), 中央濃度 0.907 ($p = 0.002$), 最小濃度 0.900 ($p = 0.002$) となり、正の相関を示した。感受性試験において β -defensin 3およびhistatin 5すべての濃度において阻止円を形成せず、薬効効果を示すほどの抗菌作用はないことが明らかになった。

以上の結果より、唾液検査を実施するにあたり義歯性口内炎や誤嚥性肺炎などの感染症予防に関するリスク評価に関して以下の結論を得た。

1. IgAは午前中に低値を示す日内変動を認めた。
2. β -defensin 3, histatin 5 および IgA の有意な日間変動は認めなかった。

3. さまざまな口腔疾患を予防する個々の宿主因子の抗菌能を知るために、午前中に低い値の IgA を検出するのが望ましい。
4. Histatin 5 は経時的に真菌数が減少する傾向を示した。ゆえに、histatin 5 の低下は感染リスクの増加につながる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ono Masanori, Watanabe Takehiro, Kimoto Suguru, Kobayashi Ryoki, Kono Tetsuro, Kurita-Ochiai Tomoko, Kawai Yasuhiko	4. 巻 17
2. 論文標題 Effect of Concentration and Time on the Antimicrobial Activity of Human Saliva against <i>Candida albicans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-Medical Sciences;	6. 最初と最後の頁 114 ~ 119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5466/ijoms.17.114	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ono Masanori, Watanabe Takehiro, Kimoto Suguru, Kobayashi Ryoki, Kurita-Ochiai Tomoko, Kawai Yasuhiko	4. 巻 18
2. 論文標題 The Intraday and Day-to-Day Fluctuation of the Antimicrobial Properties in Saliva as an Indicator of Resistance to the Oral Mucosal Disease;	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-Medical Sciences;	6. 最初と最後の頁 110-114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5466/ijoms.18.110	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kawai Y, Ono M, Meguro A, Kobayashi R, Kurita-Ochiai T, Murata H, Kimoto K, Minakuchi S
2. 発表標題 Antimicrobial effect of beta-defensin3 and histatin5 against <i>Candida albicans</i>
3. 学会等名 4th Asia Pacific Regional Congress of the International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野仁徳 渡辺丈紘 木本統 古谷容 中里公昭 城野利盛 河相安彦
2. 発表標題 唾液採取時刻および曜日が安静時唾液免疫機能に及ぼす影響
3. 学会等名 公益社団法人 平成29年度 日本補綴歯科学会東京支部第21回学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	木本 統 (KIMOTO Suguru) (10267106)	日本大学・松戸歯学部・准教授 (32665)	
研究分担者	水口 俊介 (MINAKUCHI Shunsuke) (30219688)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
研究分担者	村田 比呂司 (MURATA Hiroshi) (40229993)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授 (17301)	
研究分担者	木本 克彦 (KIMOTO Katsuhiko) (70205011)	神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授 (32703)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------