

厚生労働科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業

口腔内細菌叢の変化を指標にした
後期高齢者の老人性肺炎の
予知診断システムの開発

(H19－長寿－一般－008)

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高柴 正悟

平成 20 (2008) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

口腔内細菌叢の変化を指標にした後期高齢者の老人性肺炎の 予知診断システムの開発 高柴正悟	-----	1
(資料) 高齢者検診票	-----	9
(資料) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理審査申請書	-----	13
(資料) 企業健診提案説明書	-----	35

II. 分担研究報告

1. 徳島周辺における研究協力老人保健施設の確保	-----	41
永田俊彦, 米田 哲		
2. 自立高齢者および要介護高齢者の口腔細菌叢と 生活習慣に関する基礎調査	-----	45
佐藤 勉		
3. 唾液検査による歯周病スクリーニング精度の向上	-----	51
野村義明		
4. 血清歯周病抗体価とCOPD増悪との関連性 —歯周病合併により COPD増悪は増加する?—	-----	57
寺田邦彦, 室繁郎, 伊藤穰, 三嶋理晃		
5. Potential Benefits of Serum IgG Antibody Titer against Periodontal Bacteria in the Prognosis for Periodontitis Recurrence	-----	63
Noriko Sugi, Koji Naruishi, Fumio Myokai, Hideo Arai, Kyoko Katsuragi-Fuke, Takayuki Kono, Fusanori Nishimura, Shogo Takashiba		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	73
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	75
-----------------	-------	----

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

口腔内細菌叢の変化を指標にした後期高齢者の老人性肺炎の
予知診断システムの開発

主任研究者 高柴正悟

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

口腔内の常在細菌は、超高齢者の老人性（誤嚥性）肺炎などの日和見感染症の発症に関与する。本研究は、超高齢者に多く見られる口腔細菌感染による重篤な全身疾患、とりわけ肺炎の発症予知診断システムを細菌学・感染症学的な見地から構築することを最終目的に、超高齢者の肺炎発症因子の候補を得た後、その候補因子の臨床的有用性を調べるものである。研究戦略は、高齢者の口腔内の細菌感染度を様々なバイオマーカーで調べ、同時に高齢者の ADL と内科的検査値（CRP 値など）の情報をデータベース化し、横断型およびコホート型の疫学的臨床研究を行うこととした。また、他の疫学研究と大きく異なる点は、口腔感染度は血漿中の IgG 抗体価を指標にして調べ、その老人性肺炎の発症予知診断における有用性を評価することに着目していることである。平成 19 年度は、その第一段階として、歯周病細菌に対する血漿（清）IgG 抗体価検査が超高齢者に対しても有効であり、本研究目的を達成する手段として応用可能かどうかを検討した。まず、高齢者において、歯周病細菌に対する血清 IgG 抗体価検査の有用性の検討するため、岡山大学医学部・歯学部附属病院歯周科を受診した患者について血清 IgG 抗体価検査を実施し、各年代についての血清 IgG 抗体価陽性率を調べたところ、70 歳以上の年代であっても、他の若年層と同程度の抗体産生性を有していることが明らかになった。次に、高齢者肺疾患の病態と血清 IgG 抗体価の関連性の検討するため、COPD（慢性閉塞性肺疾患）に着目し、その増悪と口腔内感染度の関連を調べるために、京都大学呼吸器内科通院中の COPD 患者 63 名（平均年齢：73.0 歳）を対象にして、血清 IgG 抗体価の測定し、その相関を統計学的に検討したところ、興味あることに COPD の増悪と歯周病菌感染度が負の相関を示すことが分かった（分担研究報告書に詳細を記載）。この結果は、加齢に伴う免疫反応の弱体化とともに、残存歯の脱落という高齢者の器質的変化に起因する歯周病菌感染度の低下の両面から鑑みて合理的なものであると考える。以上の研究成果は、血清 IgG 抗体価検査は、本研究の対象である高齢者においても適用可能であることを示唆するものであり、次年度以降の研究遂行にあたり、我々の仮説をフォローするものと考ええる。

分担研究者
永田俊彦（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授）
佐藤勉（日本歯科大学生命歯学部・准教授）

野村義明（国立保健医療科学院・口腔保健技術室長）

A. 研究目的

日本社会は著しい高齢社会に突入している。この社会構造の変化は、従来、経験し得なかった様々な軋轢をもたらしている。高齢者医療の面においては、口腔内の常在細菌が、超高齢者の老人性（誤嚥性）肺炎などの重篤な日和見感染症の発症に関与することが知られるようになった。昨今、多くの医療施設で栄養サポートチーム（NST）が組織され、超高齢者の肺炎発症予防が取り組まれるようになった。一方、介護保険制度の導入後、現場の介護体制も次第に整備されるようになってきたが、この制度は、要介護者の日常生活動作をベースに構築されているため「高齢者医療」の概念と異なる。しかしながら、「医療」と「介護」は、本来、強い連携が望まれる。

本研究は、超高齢者に多く見られる口腔細菌感染による重篤な全身疾患、とりわけ肺炎の発症予知診断システムを細菌学・感染症学的な見地から構築することを最終目的に、超高齢者の肺炎発症因子の候補を得た後、その候補因子の臨床的有用性を調べるものである。この検査システムが構築できれば、日常生活動作（ADL）によってランク分けされる要介護制度の概念を根本的に見直し、口腔感染度を基準にして老人性肺炎発症の高リスク高齢者を科学的にスクリーニング可能になるかもしれない。また、我が国の医療および介護制度の両立・連携にも貢献し得るものと考えている。

研究の戦略は、高齢者の口腔内の細菌感染度を様々なバイオマーカーで調べ、同時に高齢者の ADL と内科的検査値（CRP 値など）の情報をデータベース化し、横断型およびコホート型の疫学的臨床研究によって、老人性肺炎の発症予知に有用な検査項目の候補を列挙・評価することとした。また、とりわけ口腔感染度を血漿中の IgG 抗体価を指標にして調べ、その老人性肺炎の発症予知診断における有用性を評価す

ることに着目している。平成 19 年度は、その第一段階として、歯周病細菌に対する血漿（清）IgG 抗体価検査が超高齢者に対しても有効であり、本研究目的を達成する手段として応用可能かどうかを検討した。

B. 研究方法

B-1. 高齢者における歯周病細菌に対する血清 IgG 抗体価検査の Validation

B-1-1. 高齢者における血清 IgG 抗体価検査の有用性の検討

対象：岡山大学医学部歯学部附属病院歯周科を受診する歯周病患者 1,716 名を用いた。

歯周病細菌（抗原）：抗原は、代表的な歯周病細菌である *Porphyromonas gingivalis* (Pg) FDC381, Pg SU63, *Prevotella intermedia* (Pi) ATCC25611, Pi ATCC33563, *Actionbacillus actionomycetemcomitans* (Aa) Y4, Aa ATCC29523, Aa SUNY67, *Eikenella corrodens* (Ec) FDC1073 などの超音波破碎処理した菌体蛋白を用いた。

血清 IgG 抗体価測定：酵素免疫－ELISA 法（Murayama らの記載を改変, *Adv Dent Res*, 1988）を用いて行った。

陽性率算出方法：Pg FDC381, Pg SU63 のうちいずれかが検査値 ≥ 1 の検体を Pg に対する血清抗体価陽性と定義した。Pi 25611, Pi 33563 のうちいずれかが検査値 ≥ 1 の検体を Pi に対する血清抗体価陽性と定義した。Aa Y4, Aa 29523, Aa 67 のうちいずれかが検査値 ≥ 1 の検体を Aa に対する血清抗体価陽性と定義した。Ec 検査値 ≥ 1 の検体を Ec に対する血清抗体価陽性と定義した。以上の結果をもとに、一定年齢以上での Pg, Pi, Aa, Ec に対する血清抗体価陽性率（歯周病陽性率）を算出し、各年代間の違いを比較検討した。

B-1-2. 高齢者肺疾患の病態と血清 IgG 抗

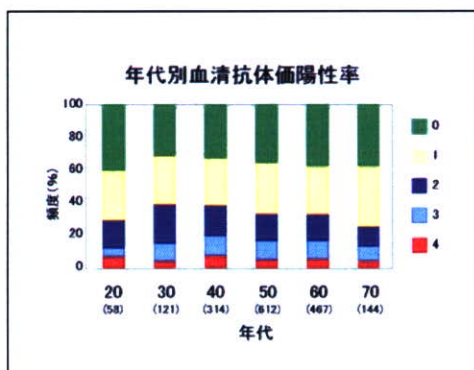
体価の関連性の検討

研究協力者、寺田邦彦先生（京都大学医学部附属病院呼吸器内科）らの報告に詳細を記載している（後述）。

C. 研究結果

C-1. 高齢者における歯周病細菌に対する血清 IgG 抗体価検査の有効性

岡山大学医学部・歯学部附属病院歯周科を受診した患者について、歯周病細菌に対する血清 IgG 抗体価検査を実施し、各年代についての血清 IgG 抗体価陽性率を調べた。右図に示すように、70 歳以上の年代であっても、他の年代と同程度の抗体産生性を有していることが明らかになった（下図参照）。



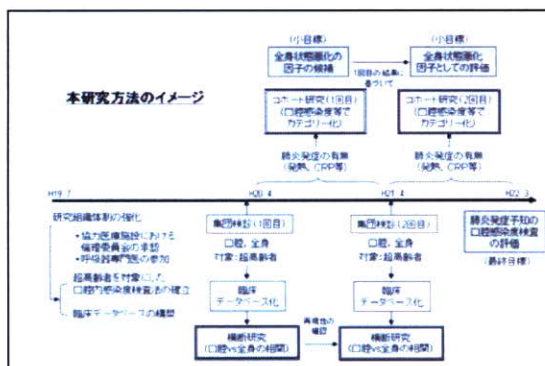
C-2. 高齢者肺疾患の病態と血清 IgG 抗体価の関連性

1. Pg FDC381, SU63 に対する抗体価陽性群で有意に増悪の程度が減少した（単変量解析）。
2. Pg FDC381, SU63 に対する抗体価陽性は頻回増悪の減少と関連していた（多変量解析）

詳細は、研究協力者、寺田邦彦先生（京都大学医学部附属病院呼吸器内科）らの報告を参照。

D. 考察

本研究は、意思疎通困難な超高齢者を含めて、高齢者（対照として若年層）の口腔、全身の臨床検査のデータを集積し、統計学的に検討する「疫学研究」のスタイルで実施されるので、研究開始前に倫理的な問題が生じないように配慮する必要があった。また、研究結果の信憑性を高めるためには、検査、検診対象のサンプルサイズを可能な限り増やすことが重要な要素であった。さらに、今年度当初に開催した研究班の会議において、研究実施に際して行われる検査・検診によって得られる膨大なデータを処理、管理する体制整備が必須であるという点について意見の一致をみた。したがって、今年度は検査システムの確立、および研究実施体制を十分に整備しておくことが、最終的な有益な結果を得る近道であるというコンセプトのもと、後述の成果を得た。



まず、本研究は最終的に老人性肺炎の発症についての「確定診断」が必要になるので、呼吸器専門の医師の協力が必須であると考えられたので、研究協力者として呼吸器専門医の参加の了承を得た（京都大学医学部呼吸器内科所属の医師）。これによって、研究組織の体制が一層強化され、次年度以降の研究デザインが確定した（上図、研究方法のイメージを参照）。

本研究実施における倫理的な諸問題については、岡山大学大学院医歯薬総合研究


科の倫理審査委員会に申請して承認された。なお、他の医療機関においても承認されている。以下に代表的な医療機関を記載する。①医療法人里仁会興生総合病院（〒723-0052 広島県三原市皆実町 1427-1）、②医療法人長光会長島病院（〒709-0861 岡山市瀬戸町瀬戸 40-1）、③特定医療法人万成病院（〒700-0761 岡山市谷万成 1-6-5）、④財団法人江原積善会積善病院（〒708-0883 津山市一方 140）。このような多くの市中病院においては、急性期患者の他にも慢性的器質低下・廃用などによる所謂老年病の高齢者が多数入院されているおり、残念ながら老人性肺炎が頻発している状況にある。

この高齢者医療状況の中で、昨今、多くの医療施設で栄養サポートチーム（NST）が組織され、超高齢者の肺炎発症予防が取り組まれるようになった。低栄養の高齢者は、免疫機能を含めて感染源に対する抵抗力が減退するので、老人性肺炎を発症するという明確なメカニズムがある。この発症予防のためには、高齢者の栄養状態改善は当然であるが、体内に侵入する感染源の量を減少させることも重要であるので、我々は口腔内細菌を含めた老廃物の徹底除去に着目している。本研究では、血漿 IgG 抗体価検査による老人性肺炎発症の予知診断システムの構築を目指しているものの、その効果判定のために、適切な口腔ケアの手法を確立し、口腔内感染源が減少した状態での抗体価測定も必須であると考えている。したがって今年度は、以

主な口腔アセスメントの視点

口腔アセスメントの視点

項目	主な視点
歯	食物残渣の有無
歯肉	発赤・腫脹・出血
舌	乾燥・発赤・腫脹・潰瘍・舌苔とその色
粘膜	発赤・腫脹・潰瘍・乾燥
嚥下	舌の動き・咽頭反射・むせやつかえ感の有無
唾液	量・粘稠度
口唇	乾燥・口角の乾燥と亀裂の有無


口腔衛生指導・粘膜保護の重要なポイント

下に記述するような口腔ケア法の確立にも着眼した。

高齢者の免疫機能は加齢に伴い弱体する傾向にあるので、わずかな口腔衛生状態の不良であっても、日和見感染症が発症する可能性がある。このような高齢者に対しては、健常者に対する口腔衛生指導・管理とは異なった視点から対応する必要性がある（主な注意点・視点は上述のとおり）。そこで、高齢者に対する口腔ケアの手法を確立するためのモデルとして、免疫機能が極度に低下する造血幹細胞移植術（骨髄移植）を受ける白血病患者に対する口腔ケア法を応用することを考えた。対象は、岡山大学医学部・歯学部附属病院血液腫瘍内科に入院中の造血幹細胞移植患者とした。評価は、我々が考案した口腔アセスメント表（下にアセスメント表の一例を示す）にしたがって患者の日々の口腔内の状況を記載し、その状態推移を注意深く観察することによって行った。

まず、口腔ケア用の歯ブラシの選択は

口腔アセスメント表の一例

口腔内観察表

項目	氏名 ()						
	1月1日	1月2日	1月3日	1月4日	1月5日	1月6日	1月7日
発熱 (℃)	36.5	36.8	37.0	37.2	37.5	37.8	38.0
スクリーン	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
口腔観察	歯肉 正常	歯肉 正常	歯肉 正常	歯肉 正常	歯肉 正常	歯肉 正常	歯肉 正常
舌	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥
粘膜	正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常
嚥下	正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常
唾液	量 正常	量 正常	量 正常	量 正常	量 正常	量 正常	量 正常
口唇	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥
歯	食物残渣	食物残渣	食物残渣	食物残渣	食物残渣	食物残渣	食物残渣
歯肉	発赤	発赤	発赤	発赤	発赤	発赤	発赤
舌	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥
粘膜	正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常
嚥下	正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常
唾液	量 正常	量 正常	量 正常	量 正常	量 正常	量 正常	量 正常
口唇	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥
歯	食物残渣	食物残渣	食物残渣	食物残渣	食物残渣	食物残渣	食物残渣
歯肉	発赤	発赤	発赤	発赤	発赤	発赤	発赤
舌	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥
粘膜	正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常
嚥下	正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常
唾液	量 正常	量 正常	量 正常	量 正常	量 正常	量 正常	量 正常
口唇	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥
歯	食物残渣	食物残渣	食物残渣	食物残渣	食物残渣	食物残渣	食物残渣
歯肉	発赤	発赤	発赤	発赤	発赤	発赤	発赤
舌	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥
粘膜	正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常
嚥下	正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常
唾液	量 正常	量 正常	量 正常	量 正常	量 正常	量 正常	量 正常
口唇	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥

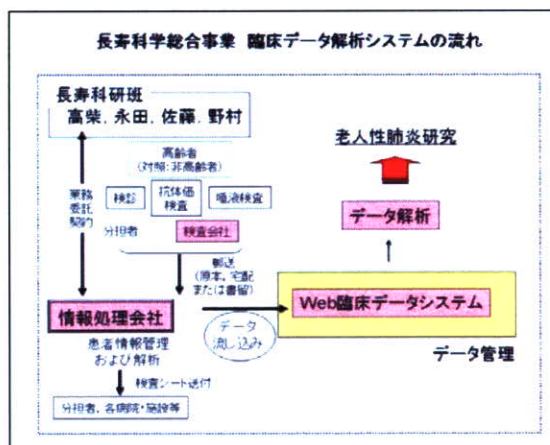
重要であると考え、患者の口腔内の状況、口腔乾燥、口腔粘膜のびらんなどに適応する条件として、①口腔粘膜に傷をつくらぬ、②患者自身が操作しやすい、そして③

介助者が操作しやすい、という3点があるという結論を得た。そのための具体的な条件は、①毛先が軟らかい、②ヘッドが小さい、③歯磨圧のコントロールが想像しやすく調整できる、そして④把持力のコントロールが調整しやすく持ちやすい、などが挙げられる。また高齢者で問題になる真菌対策についても考慮する必要がある。すなわち、①食後は基本的な口腔ケア（ブラッシング、義歯清掃等）を行う、②抗真菌含嗽剤で含嗽する（“モグモグ”＋“ガラガラ”）、③抗真菌含嗽剤の味が苦手な時は、含嗽後に滅菌水で再度軽く含嗽する、そして最後に、④市販の保湿剤を用いて保湿する（ジェルタイプの保湿剤を用いる際には、個別包装の滅菌された綿棒を用いて塗布する）。ただし、含嗽が難しい場合は、含嗽剤を軽く口に含む程度にする。以上ように造血幹細胞移植患者に対する口腔ケアの方法を鑑みて、高齢者に対する口腔ケアのポイントは、①全身既往歴のない患者以上に清潔を保つこと、②易感染状態であること、出血傾向にあることを十分考慮すること、③日々の血液データを把握すること、④歯肉や粘膜を損傷させない効果的なケアを行うこと、⑤口腔内の状況にあった歯ブラシの選択や操作を行うこと、そして⑥口腔乾燥や口腔粘膜障害に対する予防策について考慮する、との結論を得るに至った。本研究は多くの老人施設の協力が必要なので、高齢者に対する口腔ケア法に対する共通のコンセンサスを得ることが、次年度以降の研究成果を得るために重要であると考えている。上記のような注意点を各医療施設に徹底したい。

本研究で用いる血漿 IgG 抗体価測定検査は、生体反応、とりわけ免疫反応に期待するものなので、それが減退した傾向にある高齢者にとって適用可能かどうかを確認する必要がある。そこで、岡山大学医学部・歯学部附属病院歯周科を受診した患者について、歯周病細菌に対する血清 IgG 抗

体価検査を実施し、各年代についての血清 IgG 抗体価陽性率を調べた。結果の項に示すように、70 歳以上の高齢者層であっても、他の年代と同程度の抗体産生性を有していることが明らかになった。この結果は、血清 IgG 抗体価検査が、免疫反応が低下する高齢者であっても使用可能であることを示唆するものである。この確証を得るためには、すべての患者の口腔内検診を行い、歯周炎の進行程度を把握し、それらの関連性を統計学的に検討する必要がある。この点については、平成 20 年度以降の課題であると考えている。

また、本研究の骨子となる高齢者検診表を作成した。検診内容は、従来、多くの医療機関における研究で調べられている項目を列挙した（本稿別添の表参照）。本研究では、それに加えて、歯周病細菌に対する血漿 IgG 抗体価検査、唾液中遊離ヘモグロビン量および唾液中 LDH の測定を行うこととした。これらの項目は、我々の研究の独創的な内容であるので、これらが高齢者における老人性肺炎の発症予知に関わる因子となるかどうかを注視したい。



このように、本研究は多くの高齢者の検診を行い、結果的に膨大な患者臨床情報を得ることになるので、その整理を確実に行わなければならない。また、個人情報扱うことになるので、セキュリティ機能を

強化した臨床データベースの構築を行い、平成20年度以降の研究が円滑に行える体制を整備した（前掲の臨床データ解析システムの流れ図参照）。

本研究の有益な成果を得るために、研究組織の強化が重要であった。すなわち、老人性肺炎の診断等を担当する呼吸器内科専門の医師に研究協力を依頼し、その承諾を得た（京都大学医学部呼吸器内科・三嶋教授他3名）。今年度は、体制整備に重点を置いていたため、老人施設での検診等を行うことができない状況であった。しかしながら彼らの発案によって、今年度はCOPD（慢性閉塞性肺疾患）の増悪と口腔内感染度の関連を調べることにした（分担研究報告書に詳細を示す）。京都大学呼吸器内科通院中のCOPD患者63名（平均年齢：73.0歳）を対象にして、歯周病細菌に対する血清IgG抗体価の測定し、その相関を統計学的に検討したところ、興味あることにCOPDの増悪と歯周病菌感染度が負の相関を示すことが分かった。このことは、加齢に伴う免疫反応の弱体化とともに、残存歯の脱落という高齢者の器質の変化に起因する歯周病菌感染度の低下の両面から鑑みて合理的なものであると考える。すなわち、高齢者の肺疾患において、歯周病細菌感染が何らかの関連性を有するという我々の仮説の信憑性をフォローする結果であり、今後のさらなる研究発展に期待する。

高齢者を対象にした臨床疫学研究を行うにあたり、研究デザインの確立、とりわけ対照群の設定は重要である。本研究の対照としては老人性肺炎を発症しない患者群はもちろんであるが、やはり若年層の生体反応、臨床データとの比較を考慮すべきである。本研究は、歯周病細菌に対する患者の抗体産生性を調べる研究なので、若年層の中でも歯周病患者・非歯周病患者（健常者）群に群分けする必要がある。したがって対照群は大規模な集団を研究対象とす

る戦略が望ましい。この点を解決するためには、特に健常対照群のことを鑑みて、例えば岡山大学医学部・歯学部附属病院歯周科外来を受診する患者のみを研究対象とするのみでは不十分である。そこで我々は民間企業の歯科健診を行うことで、健常者を含めた対照群の確保を目指すこととした。

（於トヨタ自動車株式会社）。

歯周病は“Silent Disease”とも言われ、重症化するまで自覚症状が現れない。したがって歯科健診、歯科ドックによる定期的な歯周病健診の実施は疾患の早期発見に必須である。一方、歯科健診は煩雑な操作が必要なので、術者・健診者ともに労力を要する。我々は、この対照群の模索時において、歯周病細菌に対する血清（漿）抗体価検査を歯科健診、歯科ドックの項目に組み入れることで、歯周病罹患のスクリーニングを行うことが可能かもしれないという発想を持った。今後、企業等に働きかけを行い、スクリーニング検査としての有用性を啓蒙すると同時に、日本国民に対する我々の医療概念の普及に努めることで、歯周病細菌に対する血清（漿）抗体価検査があらゆる方面で応用されるようになることを望む。

E. 結論

本年度は研究体制の基盤整備を中心に実施した。その結果、呼吸器内科専門の医師の協力を得ることになった。また、歯周病細菌に対する血漿IgG抗体価検査の臨床的有用性の確証を得た。以上のことから、次年度以降の研究発展を期待し得る成果を得たと考える。

F. 健康危険情報

特に記載事項はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugiura Y, Soga Y, Tanimoto I, Koikeguchi S, Nishide S, Kono K,

Takahashi K, Fujii N, Ishimaru F, Tanimoto M, Yamabe K, Tsutani S, Nishimura F, Takashiba S. Antimicrobial effects of the saliva substitute, Oralbalance®, against microorganisms from oral mucosa in the hematopoietic cell transplantation period. Support Care Cancer, 2008, in press.

2. 学会発表

1. 久枝 綾ら, 歯周病細菌感染度診断のための血清IgG抗体価検査の臨床的有用性—血清バンク(バイオバンクジャパン)試料での検討—, 平成21年4月25~26日, 大宮にて開催の第51回春期日本歯周病学会学術集会において演題登録済み。
2. 工藤値英子ら, 歯周病細菌感染度検査のための指尖血漿IgG抗体価の臨床的評価—中間報告—, 平成21年4月25~26日, 大宮にて開催の第51回春期日本歯周病学会学術集会において演題登録済み。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に記載事項はない。

—参考—

血清IgG抗体価検査の測定方法

【試薬】

- 1) 基本試薬の処方
Buffer A : 0.2 mol/l Na_2CO_3 水溶液
Buffer B : 0.2 mol/l NaHCO_3 水溶液
- ① 抗原調整液
Buffer A (12 ml) + Buffer B (25.5 ml) + H_2O (112.5ml) 混合液 (pH=9.6)
- ② well 洗浄液 (pH=7.4)
PBST (Phosphate buffered saline 含有 Tween 20) を Calibrator 調整液とした。

- 2) 検量用標準物質調整液処方と設定
PBST (Phosphate buffered saline 含有 Tween 20) を検量用標準物質調整液とした。PBSTはサンプル希釈用, 洗浄用に分けて使用した。

① PBSTの試薬処方

サンプル希釈は NaCl 8.0 g (洗浄用は 80g), KH_2PO_4 0.2g (2g), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g (29g), KCl 0.2g (2g), NaN_3 0.2g (2g), Tween 20 0.5ml (5ml)を H_2O 1L (10ml)にした(pH=7.4)。

② 検量用標準物質の設定

複数の20歳代の非歯周病健康者3名の血清をプール化し, 検量線用コントロールの検量用標準物質とした。

3) 測定試薬の処方

Diethanolamin buffer として $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 gを H_2O で 800 ml 溶解した。

更に Diethanolamine buffer 9.7ml, NaN_3 1.2 gを加え, 全量 H_2O で 1 l とした。両試薬を混和後, pH=9.8 に調整した。

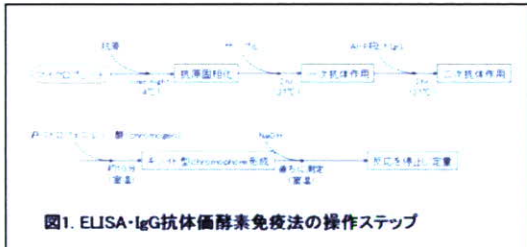
① IgG 抗体 : ALP ヒト IgG 抗体粉末 (Jackson Immuno Research) 1 本を H_2O 500 μl に溶解した。用に臨み, この 26 μl を PBST (検体希釈用) 130 ml で希釈して用いた。

② パラニトロフェニルリン酸 : 140 mg を diethanolamine 140 ml で溶解した。

③ NaOH : 3N-NaOH

【操作反応の展開】

この酵素免疫測定法は5段階操作から成り, 操作は抗原の固定化を含めて2日間を要す(図1)。



【測定法】

本法は酵素免疫-ELISA 法 (Murayama らの記載を改変, *Adv Dent Res*, 1988) である。その操作法は以下の要領で行った。

1. 検量線サンプルの調整：検量用標準物質を 12.5, 50, 200, 800, 3200, 12800, 51200 倍の段階希釈液を調整した。
2. サンプルの調整：サンプル血清 4 μl を PBST (サンプル希釈用) 12.4 ml に溶かし約 13 倍希釈血漿としたのち、密栓し、4 $^{\circ}\text{C}$ 下にて over night した。
3. 抗原のコーティング：抗原調整液 11 ml に抗原液 110 μl を溶かし、ELISA プレート (Greiner) の各 well に 100 μl ずつ加えたのちラップで密封し、4 $^{\circ}\text{C}$ 下にて over night した。
4. プレート洗浄：over night させたプレートをプレートウォッシャー (BIO-RAD) によって洗浄用 PBST で洗浄した。
5. サンプル (一次抗体) の添加：各サンプルをプレート配列させ、規定に従って各 well に 100 μl 添加した。終了後ラップに包み、37 $^{\circ}\text{C}$ 下にて 2 時間反応させた。
6. プレート洗浄：操作 4. と同様に実施し、B/F 分離させた。
7. 二次抗体の添加：ALP - ヒト IgG 抗体希釈溶液を各プレート well に 100 μl 添加した。更にプレートをラップに包ん

- で、37 $^{\circ}\text{C}$ 下にて 2 h 反応させた。
8. プレート洗浄：操作 4. と同様に実施し、B/F 分離させた。
9. 呈色剤添加 (呈色)：パラニトロフェニルリン酸溶液をプレート well に 100 μl 添加した。プレートをラップに包み、37 $^{\circ}\text{C}$ 下にて約 10 分発色させた。
10. NaOH 添加 (反応停止)：3N-NaOH を各 well に 50 μl 添加した。
11. 呈色：マイクロプレートリーダー (BIO-RAD) で測定 (吸光度：M405nm, R490nm) した。

【検量線および標準値 (検査値) の算出方法】

20 歳代の 3 名の健常者血清をプール化し、それを分析用の calibrator として用いた。この calibrator 用コントロール血清を 12.5, 50, 200, 800, 3200, 12800, 51200 倍の段階希釈液を調整し、本操作に従って検量線を描いた。この時、反応吸光度は ELISA Units (EU) に相当するとした。EU 価は calibrator 血清の 3200 倍希釈点 100 EU と定義した。Abs. 405 値の 6.25, 25, 100, 400, 1600, 6400, 25600 の希釈定数は EU 値として適応させた。

検査値は 20 歳代の非歯周病健常者群 11 名の 2 SD 幅で IgG 抗体価を Index 化し、EU 値を以下の式で演算させ、標準値 (SDI) を求めた。

検査値 (標準値) =

$$[\text{患者 IgG 抗体価 (EU}_i) - \text{健常者平均 IgG 抗体価 (EU}_x)] / 2SD$$

なお、標準値 1.0 以上を歯周病陽性と判定するものの、陽性陰性の基準 (カットオフ値) 決定には、今後のさらなる検討が必要である。

厚生労働科研長寿科学総合事業 (検診時用)

診査結果の提出先: 〒114-0015 東京都北区中里2-18-5 (株)山手情報処理センター
阿部俊一様 TEL 03-3949-4521, e-mail: abe@yamate-info.co.jp

医療機関名	診査者名	D-名	DH名	IDN ^o .	診査日	年	月	日				
患者氏名	性別	男	女	年齢	歳	身長	cm	体重	kg	喫煙の有無	有	無

口腔内状態	現存菌数	口腔乾燥	普通・乾燥	養菌の状況	使用	清掃状態	良好・不良	口腔清掃	良好・不良	口腔ケア	有(清拭・嚥下訓練)・無	嚥下障害の有無	有	無
--------------	------	------	-------	-------	----	------	-------	------	-------	------	--------------	---------	---	---

歯周組織検査

顎	歯石(+:あり, -:なし)	右							左						
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
頰側	出血(BOP)(V:あり)														
	ホケツ外深さ(mm)														
口蓋側	出血(BOP)(V:あり)														
	ホケツ外深さ(mm)														
下顎側	出血(BOP)(V:あり)														
	ホケツ外深さ(mm)														
舌側	出血(BOP)(V:あり)														
	ホケツ外深さ(mm)														
頰側	出血(BOP)(V:あり)														
	ホケツ外深さ(mm)														
	歯石(+:あり, -:なし)														

CPI (0~4) 個人コード^{*} (最大値)

16/17	11	26/27
46/47	31	36/37

0:健全
1:ブローピンツ後の出血
2:歯石沈着
3:浅いホケツ(4~5mm)
4:深いホケツ(6mm以上)
x:診査対象外

細菌検査 (検診時)

総菌数	A.a	P.g	P.i
-----	-----	-----	-----

唾液検査 (検診時)

唾液量	ml	LDH	unit/ml	遊離ヘモグロビン	mg/dl
-----	----	-----	---------	----------	-------

血清IgG抗体価 (検診時)

A.a	E.c	総IgG
P.g	P.i	

日常生活

介護給付の状況

自立・要支援1・要支援2・経過的要介護・要介護1・要介護2・要介護3・要介護4・要介護5

食事摂取

普通食・軟食・流動食・代替栄養(経鼻・胃瘻)

基礎疾患

脳血管障害	心臓疾患	その他(基礎疾患名を記入)
有・無	有・無	

肺炎の既往

有・無

CRP

特記事項

必須項目 選択項目

厚生労働科 研長寿科学総合事業 (発熱時用)

診査結果の提出先: 〒114-0015 東京都北区中里2-18-5 (株) 山手情報処理センター
阿部俊一様 TEL 03-3949-4521, e-mail: abe@yamate-info.co.jp

医療機関名	診査者名	Dr名	DH名	IDNo.	記入日	年	月	日			
患者氏名	性別	男	女	年齢	身長	cm	体重	kg	喫煙の有無	有	無

発熱(37.5度以上)

検診時からの日数	体温(度)	CRP	内科的診断名
日目			

37.5度以上の発熱日数	最高体温(度)
連続 日間	

唾液検査

唾液量	ml	LDH	unit/ml	遊離ヘモグロビン	mg/dl
-----	----	-----	---------	----------	-------

細菌検査

総菌数	Aa	P.g	P.i
-----	----	-----	-----

特記事項

血清IgG抗体価

Aa	Ec	総IgG
P.g	P.i	

<input type="checkbox"/> 必須項目 <input type="checkbox"/> 選択項目
<input type="checkbox"/> 初回検診時のデータを転用

厚生労働科研長寿科学総合事業 (発熱時用)

診査結果の提出先: 〒114-0015 東京都北区中里2-18-5 (株)山手情報処理センター
阿部俊一様 TEL 03-3949-4521, e-mail: abe@yamate-info.co.jp

医療機関名	診査者名	Dr名	DH名	IDNo.	記入日	年	月	日		
患者氏名	性別	男・女	年齢	歳	身長	cm	体重	kg	喫煙の有無	有・無

死亡時

検診時から日数	日目
原因	

特記事項

<input type="checkbox"/> 必須項目 <input type="checkbox"/> 選択項目
<input type="checkbox"/> 初回検診時のデータを転用

疫学研究 ヒトゲノム・遺伝子解析研究 臨床研究等
倫 理 審 査 申 請 書

申請日：平成 19 年 7 月 20 日
 受付番号：_____

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科長 殿

下記のとおり申請します。

研究責任者： 所属 大学院医歯薬学総合研究科
 病態制御科学専攻 病態機構学講座
 歯周病態学分野
 職名 教授
 氏名 高柴 正悟 印

1 課題名 口腔内細菌叢の変化を指標にした後期高齢者の老人性肺炎の予知診断システムの開発

■実施計画

- 岡山大学単独での研究
- 岡山大学を主管校とする多施設共同研究（徳島大学，日本歯科大学，国立保健医療科学院，医療法人里仁会興生総合病院，医療法人長光会長島病院，特定医療法人万成病院，財団法人江原積善会積善病院）
- 他施設を主管校とする多施設共同研究（全施設名を列举又はリストを添付）
- 出版公表原稿

2 研究分担者所属・職名・氏名

所属	職名	氏名
大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野	准教授	新井英雄
岡山大学医学部・歯学部附属病院歯周科	講師	前田博史
大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野	助教	谷本一郎
大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野	助教	成石浩司
岡山大学医学部・歯学部附属病院歯周科	助教	山本直史
岡山大学医学部・歯学部附属病院歯周科	助教	岩本義博
大学院医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻口腔・顎・顔面機能再生制御学講座歯周病態学分野	助教	塩見信行
大学院医歯薬学総合研究科生体制御科学専攻機能制御学講座歯周病態学分野	助教	畑中加珠
歯学部予防・発育加齢歯科学歯周病態学分野	研究生 (歯科医師)	工藤值英子
岡山大学医学部・歯学部附属病院歯周科	医員	久枝 綾
岡山大学医学部・歯学部附属病院歯周科	医員	妹尾京子

3 所属長等サイン(自署)

4 研究期間

- (1) 始期 : 平成 19 年 8 月開催の倫理委員会承認後 平成 年 月 日
(2) 終期 : 平成 22 年 3 月 31 日

5 添付書類

- 被験者への説明書 同意書 同意撤回書
多施設共同研究の場合：
全国等共通プロトコール 主管校(本学以外)の倫理委員会承認通知書(写)
アンケート(名称：)
その他(名称：)

6 研究等の概要(実施計画について具体的に記載すること。)

1) 研究の背景

口腔内には 500 種類を越える細菌が存在してバイオフィルムを形成し、要介護高齢者における老人性肺炎などの全身疾患の発症に関与することが知られる。昨今、要介護高齢者に対する口腔ケアの必要性が叫ばれ、とりわけ誤嚥性肺炎の発症予防に対して焦点が当てられ、口腔清掃の手法から摂食嚥下指導にまで、その範囲を広げて取り組まれている。しかしながら、これらの取り組みは、要介護高齢者の生活面での機能回復を念頭に行われているものであり、すべての要介護高齢者が対象となる。超高齢社会の我が国の現状を鑑みると、このことは家族の身体的負担増はもちろん、ひいては介護費の高騰による保険財政の圧迫は避けられない状況にあることを意味するものであり、将来の効率的な口腔ケアを行うためのシステム整備が望まれる。

我々は、老人性肺炎の病態形成における口腔細菌叢の関与の程度を細菌学的に解析した結果をもとに、高齢者各々の老人性肺炎発症の危険度を科学的な根拠に基づいて判定できれば、高齢者各々の危険度に応じた口腔ケア実施の可能性が見出せると考えた。

2) 研究の目的

本研究では、我が国の社会的な問題も鑑みて、高齢者層を対象にした口腔内細菌感染による重篤な全身疾患の発症予知診断システムを細菌学・感染症学的な見地から構築することを目的に、①高齢者の口腔内細菌叢と口腔組織破壊の新規検査システムの構築、②構築した検査システムの臨床的有用性の検討、という戦略を立てた。この新規診断システムの構築が達成できれば、口腔細菌叢を基準にして、老人性肺炎などの全身疾患発症の高リスク高齢者を科学的にスクリーニングすることが可能になり、必要な口腔ケアのレベルを各々の高齢者で区別化できる(添付図参照)。このことは、介護家族の負担の減少、あるいは介護費の抑制などの環境社会的な面の向上に貢献し得るので、非常に意義がある。

3) 研究の方法(手法について具体的に記載すること。)

高齢者の口腔内の細菌感染による組織破壊度を、各種のバイオマーカーで調べる。その際には、高齢者の日常生活動作(ADL)と内科的検査値(CRP 値など)の情報を得て、総合的に口腔感染症による老人性肺炎の発症予知診断システムを構築する。

高齢者の口腔細菌叢変化と口腔組織破壊の検出システムの構築

- ・口腔内細菌叢変化の解析(細菌検査)
- ・歯周病原性細菌に対する血清(あるいは血漿)IgG 抗体価の測定(感染度検査)
- ・唾液中の LDH 活性と遊離ヘモグロビン値の測定(歯周組織の炎症度検査)

構築した口腔細菌叢の検出システムの臨床的有用性の検証

- ・全身状態の検査値に対する「細菌検査」、「感染度検査」、および「唾液中の炎症マーカー検査」の統計学的相関(横断研究)
- ・高齢者の全身疾患発症予知診断における本検査システムの有用性の評価(コホート研究)

4) 研究の対象者(被験者)

(1)対象者種別及び人数

健常者 (人[そのうち本学の対象健常者 人])

具体的に対象とする者：

■患者 (1000 人[そのうち本学の対象患者 100 人])

具体的対象者：後期高齢者

■岡山大学医学部・歯学部附属病院を受診する外来患者

岡山大学医学部・歯学部附属病院の入院患者

■上記以外の施設(施設名：各共同研究機関)を受診する外来患者

■上記以外の施設(施設名：各共同研究機関)の入院(入所)患者

(2)対象者年齢 ■高齢者 ■成人 20歳未満 16歳以上 16歳未満

(3)対象者の募集方法 ■対象となる者に直接依頼 インターネットによる募集

ポスター掲示等による募集()

その他 ()

5) 研究の実施場所

岡山大学医学部・歯学部附属病院歯周科の外来診療室(歯学部棟2階)

大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野の研究室(歯学部棟7階)

6) 使用する既存の診療情報の種類(項目を選択し、該当項目がない場合は括弧内に記すこと。)

■(1)病歴書：■医師用 看護師用 ()

■(2)血液検査：■末梢血 ■生化学 ()

■(3)画像診断：■X線 CT MRI ()

(4)生理学検査：心電図 脳波 肺機能 ()

(5)手術の記録：術者用 麻酔医用 看護師用 ()

(6)病理学検査：細胞 組織 ()

■(7)感染症検査：■細菌 ■ウイルス ()

(8)質問紙調査：測定尺度名 ()

(9)染色体検査：生殖細胞 腫瘍細胞 ()

その他 ()

既存の診療情報は使用しない。

7) 新たに取得する診療情報の種類(項目を選択し、該当項目がない場合は括弧内に記すこと。)

■(1)病歴書：■医師用 看護師用 ()

■(2)血液検査：■末梢血 生化学 ()

■(3)画像診断：■X線 CT MRI ()

(4)生理学検査：心電図 脳波 肺機能 ()

(5)手術の記録：術者用 麻酔医用 看護師用 ()

(6)病理学検査：細胞 組織 ()

■(7)感染症検査：■細菌 ■ウイルス ()

(8)質問紙調査：測定尺度名 ()

(9)染色体検査：生殖細胞 腫瘍細胞 ()

その他 ()

新たな診療情報は取得しない。

8) 本研究のための新たな試料(資料)採取の有無

■(1)新たな試料(資料)を採取する。 健常者 ■患者

■(1-1)試料(資料)の採取は被験者の診療等に必要な検査等を実施する際に付随的に(研究に使用する量を增量して)行う。

項目：■(1)末梢血採血：採血回数：期間中 少なくとも3回 1回当たり採血量 1.0ml

(2)生理学的測定：項目 検査回数 回

(3)病理検査：細胞 病理組織 (臓器名 約 g)

■(4)細菌・ウイルス検査（定量PCRによる細菌ゲノムDNA量の測定）

□(5)質問紙検査：（測定尺度名）

（実施回数 回 1回当たり所要時間 分）

■(6)その他（唾液）

□(1-2)試料(資料)の採取は被験者の診療等に必要な検査等を実施する際に付随的に行うのではなく、本研究を実施するためだけに行う。

項目：□(1)末梢血採血：採血回数：期間中 回 1回当たり採血量 ml

□(2)生理学的測定：項目 検査回数 回

□(3)病理検査：□細胞 □病理組織（臓器名 約 g）

□(4)細菌・ウイルス検査（）

□(5)質問紙検査：（測定尺度名）

（実施回数 回 1回当たり所要時間 分）

□(6)その他（）

□(2)新たな試料(資料)は採取しない

□患者の治療に必要な検査等に用いられた残りの試料(資料)を使用する。

□医療廃棄物等として廃棄される試料(資料)を使用する。

□患者の治療に必要な検査等に用いられた残りの試料(資料)を使用しない。

9) 試料(資料)匿名化の種類

□(1)連結不可能匿名化

匿名化の方法：

■(2)連結可能匿名化

匿名化の方法：すべての試料（検体試料，診療情報等）から個人識別情報を除去してランダムに符号化（パスワード作成ソフトを利用した数字とアルファベットを含む6文字の符号）したものを用いる。匿名化符号と個人識別情報との対応の際には，研究責任者が当該患者担当研究分担者の同席の下で匿名化符号に治療後を示す枝番を付与する。なお，共同研究機関において採取された試料等の扱いについても同様で，各施設の研究責任者のみが符号化されたパスワードをもとに，当該患者を検索し，その情報を得ることができる。

連結可能匿名化する理由： ■解析結果を提供者に通知する ■提供後の臨床データが必要
■その他（解析結果を提供者の家族に通知する）

利用する個人情報： ■氏名 ■生年月日 □住所 □その他（臨床検査の結果）

注) 匿名化の工夫

データの番号付は各医療施設の研究分担者が行い，以下の2種のデータセットとなる。データの匿名化は2段階として，各医療施設内では患者およびその家族に結果をフィードバックさせる機会を設ける。第1段階匿名化では，唾液検査および血清抗体価の測定会社に患者名等が分からないようにするが，データが返却された時に患者に結果を説明できるように連結可能匿名化とする。

一方で，各医療施設のデータは，岡山大学に集積される際に再度匿名化されて，結果的に連結不可能な匿名化が行われる。すなわち老人性肺炎の診断を行う京都大学医学部呼吸器内科の共同研究者にデータが送られる際，および大学外で統計解析される際には，完全に連結不可能匿名化されたデータを扱うことになる。また，成果を公表する際には，この匿名化されたデータのみを使用する。

□(3)匿名化しない

匿名化しない理由：

10) 過去に実施された臨床研究の際に提供されている試料(資料)使用予定の有無

□(1)過去に提供されている試料(資料)を使用する

使用する試料(資料)の種類：

(1-1)被験者の同意の有無

同意あり（同意を得た時の説明書等を添付）

同意なし（研究承認後新たに同意を得る 新たに同意を得る予定はない）

(1-2)新たに同意を得ない場合の匿名化の種類

連結不可能匿名化 連結可能匿名化 匿名化しない

(1-3)新たに同意を得ず、連結不可能匿名化しない場合の説明

(1-3-1)提供者の利益や危険性：きわめて小さい 小さい かなり大きい 大きい

(1-3-2)過去に提供されている試料（資料）を使用しない場合の研究遂行の可能性：

不可能 極めて困難 可能

(1-3-3)提供者が拒否する機会の保証：

拒否できるように保証している

保証の方法：ホームページで周知 提供者に個別に通知

その他

拒否できるように保証していない

理由：

■(2)過去に提供されている試料（資料）は使用しない

11) 本研究を実施することにより予想される医学上の貢献

本研究によって、細菌学・感染症学的な見地から、高齢者層を対象にした口腔内細菌の日和見感染による重篤な全身症状の悪化に対する予知診断システムを構築できるので医学上の貢献度は高い。また、高齢者の日和見感染に対するリスク度を知ることができれば、臨床社会的な高齢者の Quality of Life (QOL) の維持のために活用できることから価値がある。

7 共同研究機関

■(1)共同研究機関がある

■(1-1)国内の機関と共同研究を行う

(1-1-1)共同研究機関の名称（多数の場合は別紙に記載し添付）

徳島大学、日本歯科大学、国立保健医療科学院、医療法人里仁会興生総合病院（所在地：〒723-0052 広島県三原市皆実町 1427-1）、医療法人長光会長島病院（所在地：〒709-0861 岡山市瀬戸町瀬戸 40-1）、特定医療法人万成病院（所在地：〒700-0761 岡山市谷万成 1-6-5）、財団法人江原積善会積善病院（所在地：〒708-0883 津山市一方 140）

(1-1-2)共同研究者 所属・職名・氏名（多数の場合は別紙に記載し添付）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授 永田 俊彦

日本歯科大学生命歯学部・衛生学講座・准教授 佐藤 勉

国立保健医療科学院・口腔保健部・口腔保健技術室長 野村 義明

日本歯科大学・名誉教授 鴨井 久一

国立保健医療科学院・口腔保健部・部長・花田 信弘

京都大学医学部・呼吸器内科・教授 三嶋 理晃

京都大学医学部・呼吸器内科・助教 伊藤 穰

京都大学医学部・呼吸器内科・助教 室 繁郎

京都大学医学部・呼吸器内科・大学院生（医師） 寺田 邦彦

医療法人里仁会興生総合病院・院長・藤原 恒太郎

医療法人里仁会興生総合病院・歯科医長・杉 典子

医療法人長光会長島病院・院長・長島 洋

医療法人里仁会興生総合病院・歯科医長・藤本 千代

特定医療法人万成病院・院長・小林 建太郎

特定医療法人万成病院・歯科医長・小林 直樹

(1-1-3) 主管となる機関の名称

岡山大学

(1-1-4) 本研究における岡山大学の役割 (該当する項目はすべて記入)

■研究の総括 ■検査 ■試料の採取 □その他 ()

(1-1-5) 他機関が主管となる場合の当該機関における倫理審査委員会の承認

□あり (承認通知書のコピーを添付)

□なし

(1-1-6) 共同研究機関に試料等の送付を行う場合の試料等匿名化の方法

□連結不可能匿名化

■連結可能匿名化

□匿名化しない

匿名化しない場合の理由:

□(1-2) 外国の機関と共同研究を行う

(1-2-1) 共同研究機関の名称 (多数の場合は別紙に記載し添付)

(1-2-2) 共同研究者 所属・職名・氏名 (多数の場合は別紙に記載し添付)

(1-2-3) 主管となる機関の名称

(1-2-4) 本研究における岡山大学の役割 (該当する項目はすべて記入)

□研究の総括 □検査 □試料の採取 □その他 ()

(1-2-5) 他機関が主管となる場合の当該機関における倫理審査委員会の承認

□あり (承認通知書のコピーを添付)

□なし

1-2-6) 共同研究機関と試料等の送付を行う場合の匿名化の方法

□連結不可能匿名化

□連結可能匿名化

□匿名化しない

匿名化しない場合の理由:

(1-2-7) 適用する倫理指針の種類

□日本の倫理指針

□相手国の倫理指針 (国名: ※相手国の指針を添付(訳文添付))

1-2-7-1) 相手国の倫理指針を適用する理由

□以下のすべての条件 (a~d) を満たす

a. 相手国において日本の指針の適用が困難

b. インフォームド・コンセントが得られている

c. 個人情報保護されている

d. 相手国において科学的・倫理的妥当性について承認されている

□相手国の基準が日本の指針よりも厳格である

□(2) 共同研究機関はない

8 研究における倫理的配慮

1) 被験者の自由な選択の保障

■(1) 何ら不利益をうけることなく自由意思で研究に参加・不参加を選択できることを保障する

■(2) 何ら不利益をうけることなく自由意思で研究に参加することを撤回できることを保障する