

- (1) Grade 2以上の血液毒性
- (2) Grade 3以上の非血液毒性
- (3) 飲用中止しても24時間以上継続するGrade 2の非血液毒性
- (4) 上記以外でも日常生活に支障を来たし、研究継続不可能

・投与量レベルの移行手順

- (1) DLT発現例数が3例中0例の場合：次の投与レベルに移行
- (2) DLT発現例数が3例中1~2例の場合：さらに3例追加し、計6例中のDLT発現例数により以下のように判断
 - ・DLT発現例数が6例中1~2例の場合：次の投与レベルに移行
 - ・DLT発現例数が6例中3例以上の場合：その投与レベルをMTDとし終了
- (3) DLT発現例数が3例中3例の場合：その投与レベルをMTDとし終了

【前期Phase II】

(目的) 水素水の有効性、安全性及び有用性の検討(デザイン) 非盲検試験

(対象) 口腔乾燥症患者

(方法) Phase Iで安全性を確認した用量以下での試験を行う。飲用水を2週間飲用。投与開始時からの差としてVASスコア25mm以上の改善が得られなかった被験者に対して、有効性および安全性につき非盲検試験を行う。水素水は、飲用水と同量を投与する。登録症例は各10例とする。Endpointを100mmVASスケールによる口腔乾燥感改善度とし、有効性の判定を行う。その他観察項目として、ガムテストによる唾液量、口腔内診査、血液・生化学検査を行う。

結果

1. 予備実験

1) 保管方法別溶存水素濃度、ORP、pHの安定性について(図1, 2, 3)

アルミパック保管では、7日後と15日後でそれぞれ0.888ppm, 0.871ppmとほぼ安定しており、30日経過後で-0.145ppmの0.851ppmと安定していた。コップに開放状態とペットボトル保管では、それぞれ1日後と5日後には0.004ppmとほとんど水素は消失されていた。

ORPとpHに関しても、同様な傾向がみられた。ORPでは、アルミパック保管では30日後も大きな変化がなく、コップ開放状態とペットボトル保管では、それぞれ6および48時間後に電位差は0となった。pHは、アルミパック保管では弱酸性を維持したが、コップ開放状態とペットボトル保管では、

それぞれ5日後と7日後には中性となった。

2) 口腔内温度(37°C)加温での溶存水素濃度の経時的変化(図4)

口腔内類似温度として37°Cを設定し、同温度に水素水を加温し、水素濃度を測定した。その結果、1分後および5分後の水素濃度は、それぞれ開始時と比較して0.518ppm、0.438ppmと低下した。しかし、1分後の水素濃度は本研究での使用する初期設定の範囲内で0.5ppm以上であった。

3) 健常人の口腔内における水素濃度の変化(図5)

水素水を1分間および5分間口腔内で含嗽した後の水素濃度を測定した。その結果、0.598ppmの水素水が、1分後で 0.521 ± 0.001 ppm、5分後で 0.496 ± 0.286 ppmとなり、それぞれ0.077ppmおよび0.102ppmの水素濃度の低下を認めた。

2. Phase I試験

登録症例は9例になり、その内訳は表1に示すごとくである。全例健常成人男性で、ガムテストでは10cc以上、さらに口腔乾燥度VASスケールでは25mm以下で乾燥感の訴えはなかった。

有害事象の結果は表2に示す。先ずレベル1に3例を登録したが、DLTは1例も出現しなかった。次にレベル2に移行し3例を登録したが、ここでもDLTは1例も出現しなかった。最後にレベル3に移行し3例を登録した。ここでは1例に飲用中止しても24時間以上継続するGrade 2の非血液毒性(下痢)が出現した。さらに1例にGrade 2の頻尿が出現し、日常生活に支障を来し飲用継続不可能となった。3例中2例においてDLTと判定した。これにより最終ドーズアップのレベル3をMTDとした。

3. 前期Phase II

1) 被験者

症例は口腔乾燥症患者で飲用水無効例。目標症例数は800ccおよび1200ccの各用量に10例ずつ。用量の選別は、食事、お茶、ジュースなどの飲用以外に口腔乾燥のために飲用している飲料水の量を参考にして決定した。組み入れ後、先ず決定した用量での飲用水を2週間飲用してもらい、その後口腔乾燥の改善度として、重症度VASスコアを測定した。そのうち、25mm以上の改善が見られなかった症例を、最終的に組み入れた。重症度VAS改善度は、800cc群で 4.1 ± 4.3 、1200cc群で 0.8 ± 5.4 であり、両群間に有意差は見られず、また効果もなかった。登録総症例数は20例であり、全例4週間以上の飲用が確認され基本解析対象例となった。被験者20例の内訳は表3に示した。水素水投与開始前における口腔乾燥症の重症度VASスコアでは、800cc群で

64.4±13.5、1200cc 群で 65.7±19.2 であり、両群間に有意差は見られなかった。安静時唾液量においても、800cc 群で 3.7±3.4、1200cc 群で 5.2±4.0 であり、両群間に有意差は見られなかった。(表 3)

2) 有効性

(1) 口腔乾燥症の重症度 VAS スコアの推移を表 4 に示す。水素水投与前と比較し、投与後 2, 4, 8 および 12 週の全ての測定時において、両群とも有意に改善した。特に 800cc 群は投与 2 週間から、また 1200cc 群も投与 12 週後目には 25mm 以上の改善を認めた。投与中の推移では、800cc 群では投与 2 週から投与 4 週には有意差 (P=0.026) をもって改善し、その他の経過でも有意差はみられなかったものの漸次改善した。1200cc 群でも、漸次改善傾向を示した。また投与後の各測定時において両群間には有意差はみられなかった。

(2) 安静時唾液分泌量の推移を表 5 に示す。水素水投与前と比較し、800cc 群では各測定時において増加傾向を示し、投与後 2, 4, 12 週では有意に増加した。また、1200cc 群では投与後 2, 4, 8 および 12 週の全てにおいて有意に増加した。投与中の推移では、両群共有意な変化はみられなかった。また、投与後の各測定時における両群間では有意差はみられなかった。(図 6, 7)

(3) 口腔内他覚所見

A) 湿り気 (図 8, 9)

口腔内の湿り気に関する他覚的視診による評価を行った。湿り気がなく、粘性の高い唾液や舌背粘膜に発赤・亀裂などの異常のあるものを「湿り気なし」、ほぼ正常な湿り気を「あり」、その中間を「少しあり」として 3 段階評価した。その結果、800cc 群では、「なし」が 50%であったが、投与 2 週目で 90%が「少しあり」「あり」となった。1200cc 群では、「なし」が 40%であったが、投与 4 週目には全例「少しあり」以上になった。

B) 口腔粘膜炎 (図 10, 11)

他覚的視診により、粘膜炎の状態を「なし」「弱い」「強い」の 3 段階で評価した。800cc 群では、60%に粘膜炎がみられ、投与 8 週目には 20%に減少した。1200cc 群では、40%に粘膜炎がみられたが、投与 8 週目には 20%に減少した。

C) 口腔内疼痛 (図 12, 13)

口腔内疼痛に関する自覚的所見による評価では、その程度により「なし」「弱い」「強い」の 3 段階で評価した。800cc 群では、70%に疼痛の訴えがあったが、投与 8 週目には 30%に減少した。1200cc 群では、40%に疼痛の訴えがあったが、投与 8 週目には 20%に減少した。

3) 安全性

有害事象の発現状況を表 6 に示す。全例 grade 2 以下の有害事象であった。項目別では、頻尿が高頻度にみられたが、有意な用量反応性はみられなかった。頻尿に次いで、顔面および口唇の浮腫が多くみられた。これによる中断例はなかったが、数日間の飲用一時中止により改善した。さらに、1200cc 群の 2 例において、grade 2 の急性腭炎とめまいが出現したが、この 2 例は投与後 8 週間を経過しており解析対象例とした。急性腭炎とめまいに関しては加療を要したが治癒した。

考察

1. 水素水の安定について

水素水中の水素濃度は不安定で早期の消失がみられた。安定した水素濃度での研究は、アルミパックで保管された水素水のみであり、開栓後は可及的に空気に触れさせず 24 時間以内に使用することが望ましいことがわかった。本研究においても、アルミパックに密封し 2 週間分の水素水を提供し、開栓後の取り扱いは前述の注意事項を徹底指示した。

高濃度水素水の生成では、電気分解により水素ガスを生成し、そのガスを一定圧下で飲用水に溶存させる「バブリング方式」と、電気分解と特殊なフィルターのみで生成し、気体を混入しない「電気分解方式」がある。前者は、容器の開栓時あるいは生成機からの給水時での水素ガスの気泡化による消失や水素水中の水素の安定性に不安がある。そのため、水素濃度の安定性という点から、今回は後者の「電気分解方式」を採用した機器のうち、日本で唯一、公的機関の日本食品衛生協会で水素濃度の検査を受けている Teco 社製高濃度水素水サーバー HWP-100LS を用いた。本機器は、水道水を逆浸透膜 (RO) により純水化し、それを電気分解により水素水に生成するもので、生成されたものは「純水」と「水素」のみとなる。

口腔内温度と類似の 37°C 加温後と健常人での水素水含嗽後の溶存水素濃度の経時的変化を測定したが、共に水素濃度が僅か低下したのみであり、また両者ともほぼ同等な値となった。消失した水素は、口腔粘膜へ浸透したのか否かは不明であるが、今後口腔乾燥症患者との比較は必要であると考えた。

2. Phase I 試験

健常成人における安全性試験では、高濃度水素水では全例に Grade 1 ないし 2 の頻尿がみられた。これは飲用量に依存することなくみられ、水素水によるものと考えられた。その他では発汗が 3 例に、疲労感が 1 例にみられたが軽微であった。1 例において Grade 2 の下痢がみられたが、治療薬など治療の必要はなく、飲用中止により症状は軽快し 2 日目に

は下痢症状は消失した。これは量依存性を否定できないと考える。移行手順によれば、レベル3で、さらに3例追加すべきであるが、最終レベルであること、またPhase II以降は、高齢者が多くなることを考え、症例追加はせずレベル3をMTDとして終了とした。これにより次の前期Phase IIでは、800ccと1200ccの水素水での検討とした。

3. 前期Phase II試験

口腔乾燥症患者を対象として、水素水の有効性と安全性の検討を行った。単に摂取水分量の不足により口腔乾燥を訴えているか否かを判別するため、先ず飲用水をPhase Iで設定した量を毎日測定し飲んでもらい、効果がない症例のみを対象とした。

飲用する水素水の量を800ccあるいは1200ccとし、対象を2群に分けて検討した。また、使用した水素水の成分は、純水と水素のみであることより、水素水の有効性を検討する際に考慮する因子としては、量的因子として「飲用する1日量」、質的因子としては「水素」だけとなる。

1) 有効性

主要評価項目を「口腔乾燥の重症度VASスコアが飲用前に比べ改善した症例の割合」とした。1日量800cc飲用群では、投与2週目から12週目までの全ての評価時点において、平均でVASが25mm改善し、その割合は8割に及んだ。1日量1200cc飲用群においても、投与12週には平均でVAS25mm以上の改善がみられ、25mm以上の改善が7割に達した。また、両群間での有意差はみられなかったことより、用量依存性はないものと思われた。飲用経過中の推移でも、800cc群で投与4週まで有意に改善し、1200cc群も含め漸次改善傾向がみられた。これらより、水素水の口腔乾燥症に対する有効性が示唆された。

その他の評価項目として、唾液分泌量の増加率を検討した。これらにおいても、飲用前に比べ有意に唾液分泌量の改善がみられた。しかし、800cc群より1200cc群の方が増加率は高いものの、両群間での有意差はみられず、用量依存性は認められなかった。飲用経過中の推移をみると投与2週での有意な増加がみられたことより、初期の段階から唾液量の増加が期待される。唾液量の評価としては、投与開始2週で可能かと思われた。唾液増加率も水素水の評価には有用と思われた。

自・他覚的所見として、口腔内の「湿り気」と「粘膜炎」の状態そして口腔内の「疼痛」の有無を評価したが、唾液分泌量の増加に伴い、3項目とも良好な改善がみられ、このことがVASの改善にも大きく関与したものとする。特に粘膜炎に関しては、含嗽剤やステロイド軟膏をしようせずに軽快したこ

とは、唾液分泌量の増加だけでなく、水素のスカベンジャーとしての抗炎症効果ではないかと思われたが、不明である。本研究中、アトピー性皮膚炎患者の皮膚炎が軽快し、ステロイド治療を必要としなくなった例もあり、粘膜炎も含めてこれらの効果についても、今後検討する必要があると思われる。800cc群と1200cc群での「湿り気」「粘膜炎」「疼痛」の変化に大きな差は認められず、これらに関しても量的因子の影響は少ないと思われた。

2) 安全性

Phase I同様、高頻度に発現した有害事象としては「頻尿」であった。これは水素水の中断により改善したことより「明らかに関連がある」と考える。日常生活に支障は出なかったが、頻尿に伴う全身への影響は危惧される。また、これに関しては、用量依存性はなかった。この利尿作用の機序は不明であり安全性の面からも検討の必要性はあると考える。

次いで多く発現したのが「顔面および口唇の浮腫」であった。治療を要するものではなかったが、唾液分泌量が著明に増加した症例にみられ、口腔内の唾液腺が反応し分泌量が増加したものの、排泄障害により浮腫として現れたものとする。軽度で自制内の疼痛を伴った著明な口唇浮腫の1例を含め、浮腫が発現した6例は、水素水の飲用一時中断により軽快した。著明な口唇浮腫の症例は、飲用12週後には自然消退し、同時に一回尿量が多いままであったが、尿の回数は投与前の状態に戻った。また「顔面および口唇の浮腫」についても用量依存性ではなく、「明らかに関連がある」と考えられた。

その他、重篤なものとして、急性腭炎の1例とめまいの1例があった。共に1日量1200ccの水素水を飲用して8週後に発現した。腭炎患者は、その治療のために経口制限があった時期を除き水素水を継続していたとのことだが、その後再発・再燃はなく経過良好となっている。同症例は唾液分泌量の著明な改善がみられたこと、発症時には水素水以外は向精神薬のみの内服だけであったことより、腭炎と水素水とは「関連あるかもしれない」と思われる。めまいを発症した患者も、唾液分泌量に著明な改善がみられた症例である。さらに顔面浮腫もみられた。めまいの治療には、3日間の内服治療が施されたが、その際に水素水を中断した。症状は急速に改善し、以降内服治療は必要なくなったとのことで、本例のめまいは水素水と「多分関連あり」と考える。顔面浮腫により頭頸部の循環不全を来した危険性が考えられる。以上より、頭頸部の浮腫の出現と著明な頻尿および唾液分泌量の増加がみられた場合には、水素水の飲用を中断すべきと考える。また、原因不明かつ未だ予期せぬ有害事象の発現の危険性もある

ことより、成長発育段階にある未成年者の飲用には充分注意が必要と考える。

本研究により、水素水の口腔乾燥症への有効性が示唆された。さらに、その有効性は用量依存性ではなく、水素によるものと考えられた。また、安全性において有害事象の発現があり、高齢者の飲用には注意を要すると思われた。以上より、後期 Phase II では、口腔乾燥症患者を対象に、1日量 800cc として高濃度水素水の有効性及び安全性の検討を行うことが妥当であると判断した。

結語

本研究により、口腔乾燥症に対する水素水の有効性とそれを用いたエビデンスのある対症療法の確立が期待される。また、これにより、う蝕および歯周病予防、さらに歯および口腔の健康を保つことにより、高齢者や要介護者に多い誤嚥性肺炎の予防などを通じて全身の健康さらに豊かな人生の基礎を築くことができ、高齢者を含む口腔乾燥患者の QOL の改善が期待できるものとする。

今回は、Phase I 及び前期 Phase II 臨床試験を行い、水素水の有効性及び安全性について検討した。水素水は、口腔乾燥症に有効であるという可能性が示唆されたが、有害事象の発現も確認された。今後は、後期 Phase II さらに Phase III へと研究を進めることにより、有効性に関する統計学的検討及び予期せぬ有害事象までもが明らかにされていくものとする。

参考文献

- 1) Ikuroh O, Masahiro I, Kumiko T, et al: Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. Nature Medicine 13, 688-694, 2007.
- 2) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE v3.0) 日本語訳 JCOG/JSCO 版. 20

図1 保管方法別溶存酸素濃度の経時変化

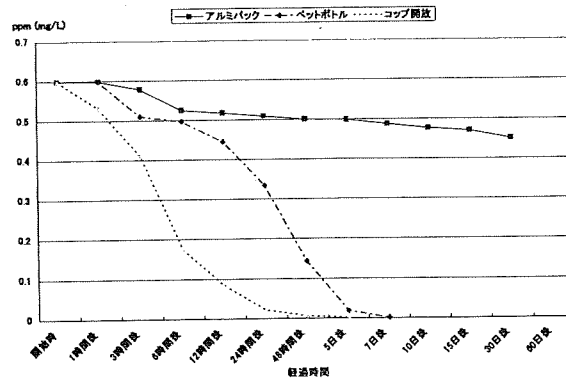


図2 保管方法別水素水酸化還元電位の経時変化

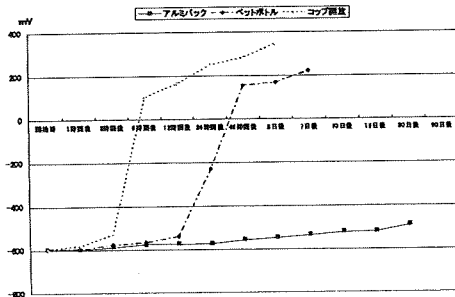


図3 保管方法別水素水pHの経時変化

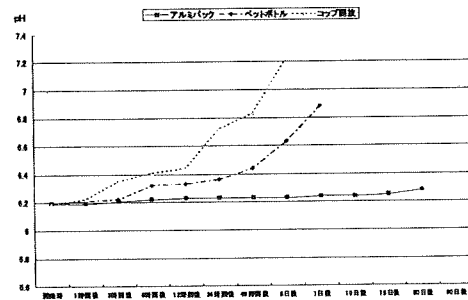


図4 37℃加温下での水素濃度の変化

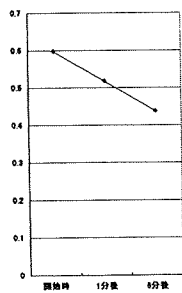


図5 含酸素の水素濃度の変化

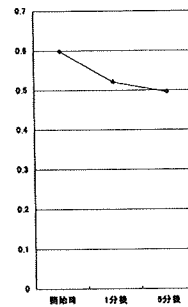


表1 Phase I の登録症例

症例	年齢	性別	ガムテスト (cc/10min.)	乾燥感 VASスコア
1	39	M	12.2	12
2	59	M	13.9	5
3	51	M	17.4	0
4	50	M	23.0	0
5	57	M	14.6	8
6	60	M	12.7	5
7	35	M	18.8	0
8	55	M	16.5	5
9	50	M	18.3	0

表2 Phase Iにおける有害事象

有害事象	投与レベル1(800cc)			投与レベル2(1200cc)			投与レベル3(1600cc)		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
全身症状									
疲労	1								
発汗		1					1	1	
消化管									
下痢							2		
腎・泌尿生殖器									
頻尿	2	1	1	2	2	1	1	2	2

表3 被験者背景

項目		800cc/日群	1200cc/日群
性別	男	0	2
	女	10	8
年齢	全体	72.0±13.3	49.1±23.3
	<65歳	3	6
	65歳≤	7	4
治療歴	新鮮例	9	8
	既治療例	1	2
原因	ストレス	2	3
	抗がん剤	4	2
	放射線	1	0
	抗がん剤+放射線	1	2
	不明	2	3
口腔乾燥症の重症度		64.4±13.5	65.7±19.2
安静時唾液量		3.7±3.4	5.2±4.0
口腔湿り気	なし	5	4
	少しあり	5	6
	あり	0	0
粘膜炎	なし	5	6
	弱い	3	2
	強い	2	2
口内疼痛	なし	3	6
	弱い	5	3
	強い	2	1
水道水による重症度改善度		4.1±4.3	0.8±5.4

表4 口腔乾燥症の重症度 VAS スコア (投与開始前からの変化)

群		投与 2 週後	投与 4 週後	投与 8 週後	投与 12 週後
800cc/日	VAS スコア	27.2±12.0	28.4±11.7	37.3±14.8	40.0±15.3
	開始前との分析	P=0.005	P=0.012	P=0.012	P=0.026
1200cc/日	VAS スコア	22.9±17.7	23.4±14.7	24.1±16.4	25.8±21.3
	開始前との分析	P=0.017	P=0.005	P=0.027	P=0.046
群間分析		P=0.314	P=0.327	P=0.345	P=0.500

検定は Wilcoxon の符号付き順位検定

表5 安静時唾液分泌量の増加率

群		投与 2 週後	投与 4 週後	投与 8 週後	投与 12 週後
800cc/日	唾液増加率	39.0±65.1	30.4±32.1	38.7±38.4	32.8±36.4
	開始前との検定	P=0.036	P=0.043	P=0.080	P=0.043
1200cc/日	唾液増加率	89.2±83.7	87.1±115.7	84.9±109.8	82.5±110.4
	開始前との検定	P=0.005	P=0.013	P=0.005	P=0.008
群間分析		P=0.139	P=0.398	P=0.237	P=0.753

唾液増加率 = (投与後唾液量 - 開始前唾液量) / 開始時唾液量 X100 で算出した%の平均±標準偏差
 検定は Wilcoxon の符号付き順位検定

表6 前期 Phase II における有害事象

有害事象	800cc/日群					1200cc/日群				
	grade				合計	grade				合計
	1	2	3	4		1	2	3	4	
全身症状										
疲労	1				1					
発汗	2				2	2				2
消化管										
下痢							2			2
腎・泌尿生殖器										
頻尿	8	2			10	3	4			7
肝胆膵										
膵炎							1			1
リンパ管										
頭頸部浮腫	3				3	2	1			3
神経										
めまい							1			1

歯周病細菌の血栓形成能の測定法の開発

研究分担者 西原 達次 九州歯科大学感染分子生物学分野
 研究協力者 中島 啓介 九州歯科大学歯周病制御再建学分野
 研究代表者 柿木 保明 九州歯科大学摂食機能リハビリテーション学分野

研究要旨

歯周病と心筋梗塞の因果関係を示唆する研究成果が数多く報告されているなかで、心筋梗塞患者の剖検例で冠状動脈梗塞化部位から歯周病細菌が検出されたことから、梗塞形成における歯周病細菌の関与が注目されている。しかし、生活習慣病の様相を呈する心筋梗塞の病因としての歯周病細菌に関する解析は進んではいるものの、その詳細なメカニズムに関しては不明な点を多く残している。

昨年度の研究事業で、我々は、マイクロチップ（アクリル樹脂基板）に突起部を配置し、その表面を Si ゴム系樹脂でコーティング処理することで、微小流路を形成させることができることに成功した。そこで、本年度の研究では、マクロファージを用いて、マイクロチップ上の突起部（100ヶ所）に付着した細胞量を測定した。

まず、ヒトおよびマウスのマクロファージ系細胞を歯周病細菌由来のリポ多糖（lipopolysaccharide; LPS）で刺激し、活性化した細胞が強く凝集することを確認した。次いで、細胞の凝集に関与する細胞表面分子をフローサイトメーターで解析したところ、LPS で刺激したマクロファージの細胞表面に、複数の細胞接着因子が強く発現されていることが明らかとなった。そこで、それぞれの分子を認識する抗体を用いて、細胞凝集の阻害実験を行ったところ、抗 intracellular adhesion molecule-1（ICAM-1）抗体で凝集塊形成が著しく抑制された。以上の結果から、歯周病細菌由来の LPS で刺激したマクロファージ系細胞に見られる細胞凝集には、細胞表面に発現された ICAM-1 が関与していることが明らかとなった。

A. 研究の目的

現在、歯周病細菌により、さまざまな全身疾患が誘発されることが指摘されているが、そのなかでも、歯周病細菌と虚血性心疾患との関連については、心筋梗塞の病巣から歯周病細菌が見出されて以来、多くに事実が明らかになってきた。さらに、*in vitro*の実験結果から、歯周病細菌が産生するプロテアーゼや細菌の表面に存在するリポ多糖（lipopolysaccharide; LPS）が冠状動脈の梗塞化を促進することが報告されている。

我々の研究グループは、図1で示すように、歯周病と心筋梗塞の関係について系統的に解析を

進めているが、これまでの研究で、歯周病細菌でマクロファージを刺激すると、泡沫化細胞を増加させて梗塞を促進していることを見出している。一方で、主たる歯周病原細菌はグラム陰性嫌気性菌で、その菌体表面成分である LPS がマクロファージを活性化し、low density lipoprotein (LDL) などの血中コレステロールとともに血栓形成を促進することは広く知られている。

しかし、臨床的に、梗塞巣で歯周病細菌が検出されるとい現象が、歯周病細菌感染によって特異的に引き起こされるのか、すでに形成された病巣に細菌が付着したものなのかについて、明確な

答えは得られておらず、歯周病細菌と梗塞巣形成の因果関係について不明確な部分を残している。このようなことから、歯周病細菌が梗塞巣を形成するメカニズムを検証する実験系の開発が求められている。

そこで、本研究事業では、マイクロチップ上に微小流路を作成し、*in vitro*で細胞の付着を観察するシステムの開発を目指して研究を進めてきた。今年度の研究では、昨年の結果を踏まえ、マクロファージ系細胞の付着状態の亢進を分子生物学的に解析し、*in vitro*での細胞凝集観察系が梗塞リスクを評価するシステムとして応用可能か否かを検証した。

B. 研究対象および方法

(1) 微小流路を形成したチップ

今年度も昨年同様、図2のように流路中に突起部（マイクロピラー）を設置したチップを使用した。

(2) 観察方法

微小流路を形成したチップを顕微鏡下で観察するシステムを構築した。この流路に流れる細胞をリアルタイムで観察し、マイクロピラー周辺に付着・集積する細胞を計測の対象とした。

(3) 計測方法

昨年と同様に、一定の領域（250x500 マイクロメートル）で形成された梗塞化部位（Sc）の面積を計測した（図3）。

(4) 解析方法

フローサイトメーターを用いて細胞表面分子の存在を解析した。さらに、ウエスタンブロット法で、ICAM-1の発現レベルを確認した。

C. 研究結果

今年度、歯周病細菌由来のLPSでヒトのマクロファージ系細胞を刺激して、マイクロチップに流したところ、未刺激群に比べて、マイクロピラーへの付着率が高いという結果が得られた。

さらに、フローサイトメーターで解析したところ、歯周病細菌由来のLPSで刺激したマクロファ

ージの細胞表面にICAM-1が強発現されていることが明らかとなった。あわせて、ウエスタンブロット法を用いて、LPSで刺激したマウスマクロファージで、ICAM-1の発現が亢進していることを確認した（図4）。

そこで、マクロファージ表面に発現されたICAM-1の機能を解析するために、抗ICAM-1抗体を用い、この抗体で前培養したマクロファージの凝集能を調べたところ、LPSで刺激したマクロファージの凝集が著しく抑制された（図5）。

D. 考察

心筋梗塞は典型的な生活習慣病であり、その発症の背景となる梗塞巣形成には、血液中のコレステロール、なかでもLDLと酸化LDLが重要な因子として作用することは広く知られている。我々の研究グループは、そのような発症要因に加えて、歯周病細菌が心筋梗塞を始めとする心血管系障害の誘発因子として作用することを報告してきた。

さらに、今回の研究事業で、マイクロチップ中に微小流路を形成し、*in vitro*の観察系で細胞の凝集を観察できる実験系を確立した。昨年度は、この系を用いて、歯周病細菌由来のLPSで刺激したマウスマクロファージの細胞凝集能が亢進することを見出した。そこで、今年度の研究事業では、歯周病細菌由来のLPSで刺激したヒト由来のマクロファージで検証したところ、同様の結果が得られた。

次に、歯周病細菌由来のLPS刺激により、マクロファージの細胞凝集能が亢進するという現象がどのようなメカニズムで起きているのかを検証した。まず、フローサイトメーターおよびウエスタンブロットによる解析の結果、いくつかの細胞接着因子が細胞表面に発現されていることが明らかとなった。さらに、ウエスタンブロットで、ICAM-1の発現の亢進を確認することができた。このことから、ICAM-1を始めとする複数の細胞接着因子が細胞凝集、それにともなう梗塞巣の形成に関与している可能性が強く示唆された。

そこで、今回、歯周病細菌由来の LPS でマクロファージを刺激して、その後、抗 ICAM-1 抗体で処理して、マイクロチップの流路系に細胞を流通させて、細胞凝集がどのように変化するかを調べた。今回、抗 ICAM-1 抗体処理群で、マクロファージの細胞凝集が強く抑制されることが明らかとなった。

以上の結果から、歯周病細菌由来の LPS で刺激したマクロファージの細胞凝集において、マクロファージの細胞表層に存在する接着因子 ICAM-1 が深く関わっていることが強く示唆された。

E. 結論

今回の研究で開発した微小流路を用いて、歯周病細菌由来の LPS で刺激したマクロファージは付着能亢進のメカニズムを解析したところ、細胞表層の ICAM-1 が細胞凝集に深く関わり、初期の梗塞巣形成を誘導している可能性が強く示唆された。

今後、歯周病細菌と血液内の LDL とが複合的に作用し、血管内で梗塞化を増強している可能性について検討する予定である。

図1 歯周病と心筋梗塞との関連について

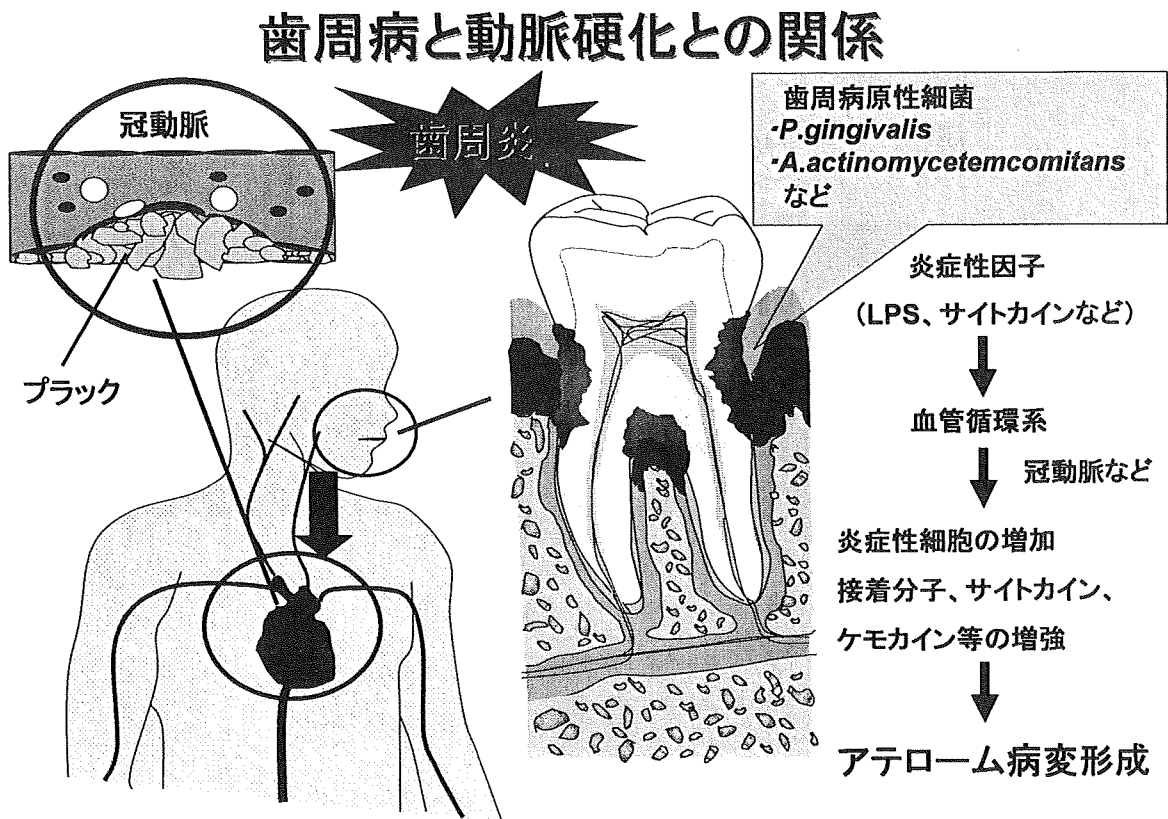


図2 今回の研究で用いたマイクロチップの模式図

微小流路チップの概観

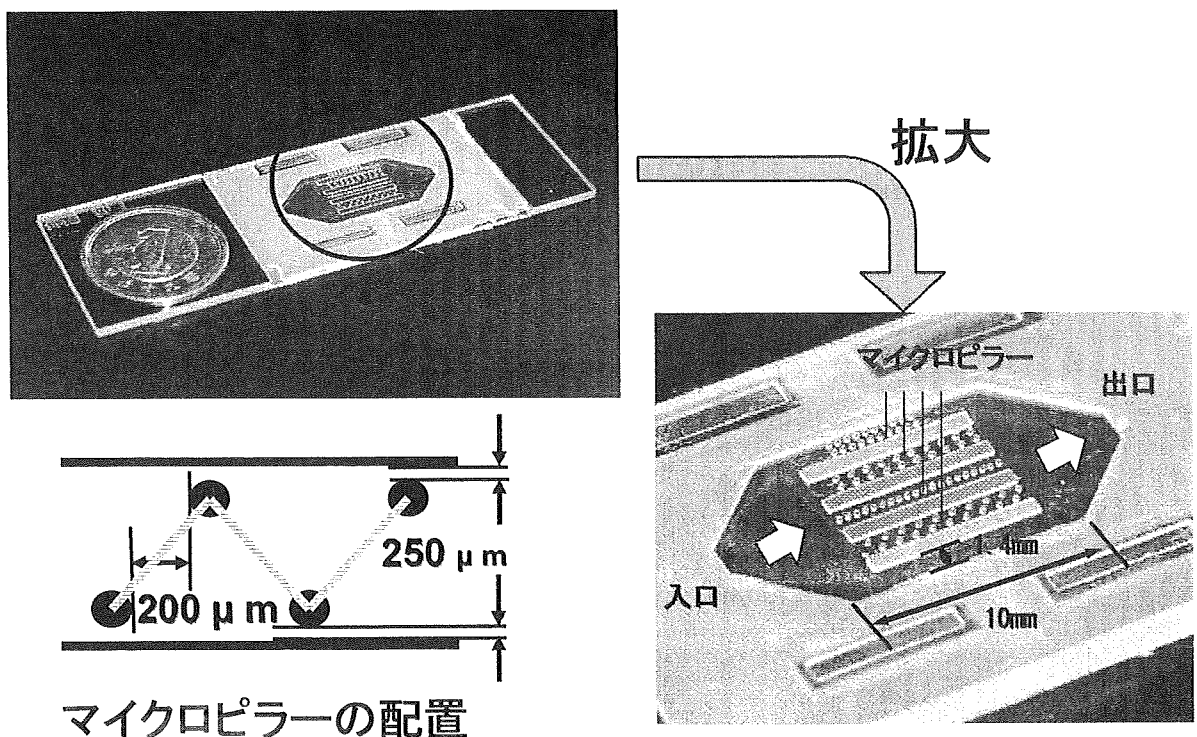


図3 今回の実験における細胞付着率の計算方法

細胞付着率の解析方法

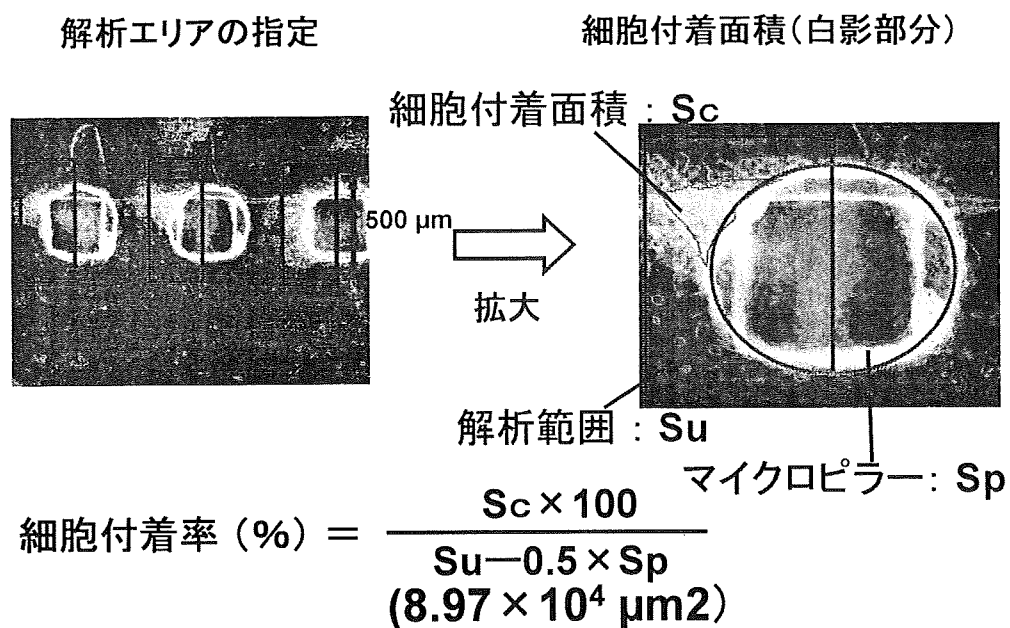


図4 歯周病細菌由来のLPSで刺激したマクロファージで見られたICAM-1の発現

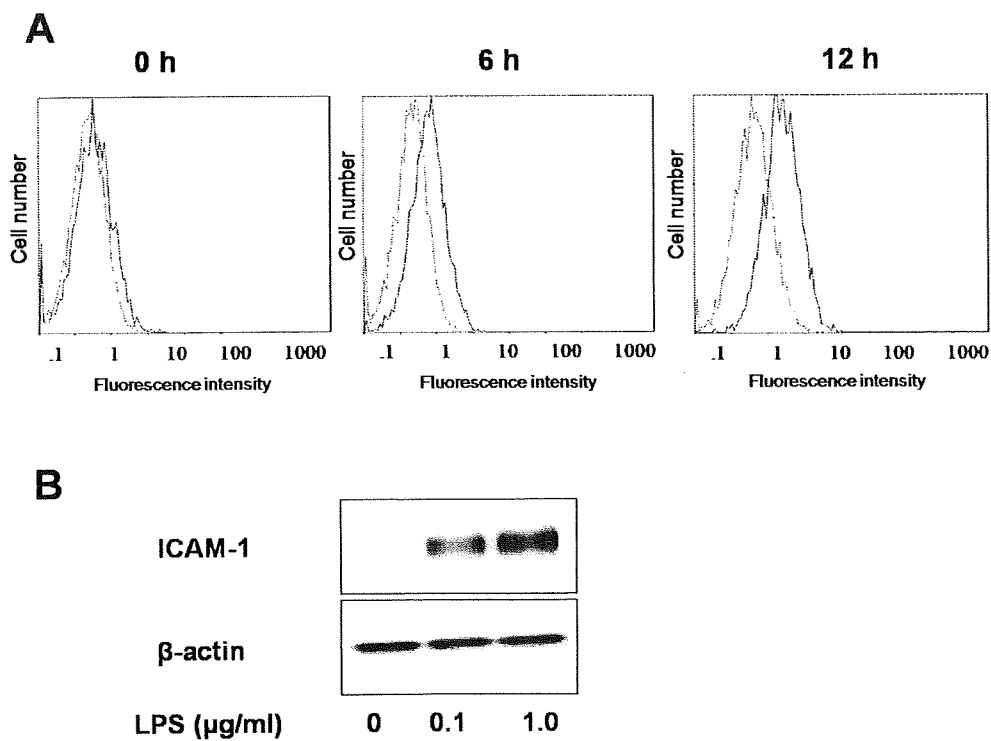
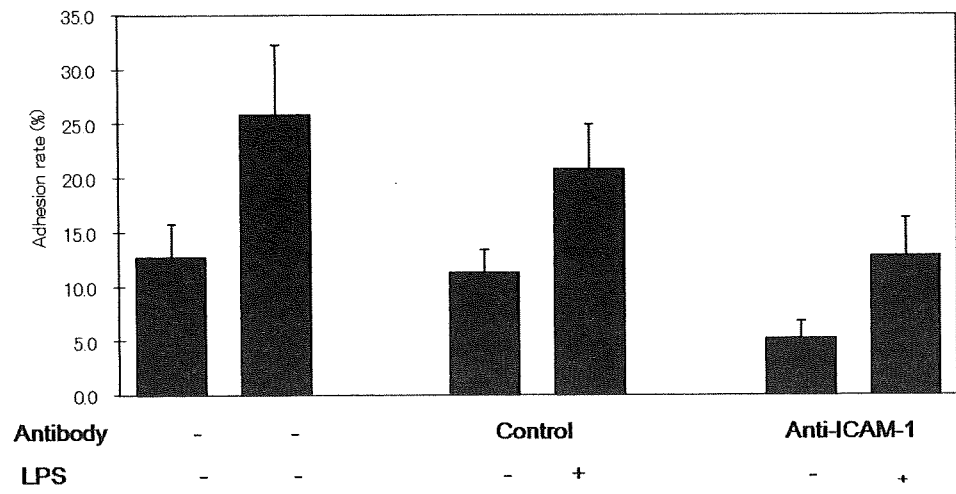


図5 抗 ICAM-1 抗体による細胞凝集能の抑制効果について



唾液中分泌量が口腔内細菌叢および抗菌活性におよぼす影響について

研究分担者 西原 達次 九州歯科大学感染分子生物学分野

研究協力者 沖永 敏則 九州歯科大学感染分子生物学分野

研究代表者 柿木 保明 九州歯科大学摂食機能リハビリテーション学分野

研究要旨

口腔内には常在菌叢が形成され、外来の病原性微生物の侵入を防ぐなど、感染防御機能の一端を担っている。口腔内の歯、歯肉、舌、あるいは唾液中には多種多様の細菌が存在しているが、このうち、唾液中には、食物残渣をはじめとする有機成分が含まれており、常在菌にとって豊かな栄養供給源となっている。一方で、唾液中には、組織体液と同様に抗菌作用を示す液性成分が含まれており、細菌の膜構造に損傷を与えて抗菌活性を示す活性物質の存在も知られている。

このように唾液による口腔内細菌への作用は多様性を示す一方で、高齢者では唾液の分泌が低下することにより、摂食機能を始めとする様々な機能が低下することが知られている。そのうち、口腔環境に関することでは、唾液の分泌低下により自浄作用が低下し、齲蝕や歯周病といった口腔内感染症が増悪する。しかし、口腔内環境という視点から、ヒトの唾液の分泌が口腔内細菌叢にどのような影響を与えているか、あるいは唾液の持つ抗菌活性に変化をおよぼしているかなどで調べられた研究は少ない。

そこで、今回、唾液の分泌量に違いがみられる2つのグループ（良好群、不良群）における総菌数、齲蝕レンサ球菌数、歯周病細菌数、真菌数を比較検討した。あわせて、唾液中の抗菌活性を調べ、唾液の分泌が口腔内細菌にどのような影響を及ぼすかを調べた。その結果、2つのグループ間で違いが見られ、唾液の分泌と口腔内細菌の間に因果関係が認められた。

A. 研究の目的

口腔乾燥症を考えるうえで、唾液の分泌量の低下とともに、質的な変化もさまざまな障害の要因になっていることを実証するために、我々の研究グループは、唾液の性状について研究を進めてきた。とくに、唾液の粘度を測定する曳糸性測定器を開発し、唾液の粘性と口腔乾燥度が相関をすることを明らかにした。

唾液中には様々な有機成分が含まれており、それらはバイオフィルムを形成する口腔内細菌にとって貴重な栄養源となっている。このような視点に立つと、唾液の分泌低下は栄養源の枯渇につ

ながるということになり、口腔内細菌の生育環境が悪くなるという考えが成り立つ。しかし、唾液の低下により食塊形成や摂食機能不全が起き、その結果、口腔内には食物残渣がたまり、口腔内細菌が増殖する際の温床となる。このようなことから、一概に唾液の分泌を口腔内細菌という観点で評価することは難しく、これまで詳細な実験結果の報告は見られない所以となっている。

一方、唾液中に含まれる抗菌物質としては、リゾチーム、ラクトフェリン、ヒスチジンなどが知られている。これらの物質を試験管内で、細菌に作用させると強い抗菌活性を発揮するが、唾液に

は個体差があるために、ヒトを被験者とした実験が難しいということもあり、これまで系統的な臨床研究はあまり見られない。

そこで、今年度の研究事業では、唾液の分泌量の違いによる口腔環境について、細菌学的に検討することとし、唾液中の細菌叢および抗菌活性について、唾液分泌の良好なグループと低下したグループに分け、それぞれどのような傾向が見られるかについて実験を行った。

今回の研究成果を踏まえて、今回の研究事業における重要な課題となる高齢者の誤嚥性肺炎の問題につなげていく。さらに、高齢者の唾液の質的变化を把握するなかで、唾液中に含まれる細菌数および細菌種を明確にしていく予定である。

B. 研究対象および方法

今回の研究では、事前に研究の趣旨を説明し承諾が得られた被験者8名を分泌良好群（4名）分泌不良群（4名）に分け、総菌数、齶蝕レンサ球菌数、真菌数を測定した。

総菌数測定は血液平板培地（ケニス社製）、齶蝕レンサ球菌数測定はYEMSB培地を用いて嫌気条件下で培養後、平板上に生育したコロニーを計測した。真菌数測定はYE培地を用いて好氣的な環境下で培養後、平板上に生育したコロニーを計測した。

今回、唾液の抗菌活性に関しては、ろ過滅菌した唾液をディスクに染み込ませ、抗生物質の抗菌活性を測定する方法として知られているディスク法で検定した。なお、抗菌活性を測定時の対象細菌として、齶蝕レンサ球菌 *Streptococcus mutans* と 菌周病細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* を用いた。

C. 研究結果

1) 細菌数について

今回、分泌良好群と分泌不良群のグループ間で、唾液中に存在する総菌数、齶蝕レンサ球菌数、真菌数に統計学的な有意差は認められなかった。しかし、分泌良好群の被験者#4と分泌不良群の被

験者#1の検出された細菌の結果（図1-4）を見ると、視覚的にも顕著な差が認められた。しかし、今回の研究では、この差が個体差によるものなのか、唾液の分泌量の違いによるものなのかを明確に判別することはできなかった。

2) 抗菌活性について

今回、被験者全員の唾液を用いて、ディスク法で、齶蝕レンサ球菌 *S. mutans* と 菌周病細菌 *A. actinomycetemcomitans* に対する抗菌活性を調べたところ、分泌良好群と分泌不良群のグループ間で有意な差は認められなかった。しかし、抗菌活性においても、細菌数と同様な傾向が認められ、分泌不良被験者#1に比べて、分泌良好被験者#4の唾液で著しい抗菌活性が認められた（図5）。

D. 考察

今回、現在、我々の研究グループは、口腔環境を唾液中の細菌叢と抗菌活性を指標として、細菌学的に検討したところ、特定の被験者ではあったが興味ある知見が得られた。

まず、唾液の分泌が良好であった被験者#4と不良であった被験者#1は、ともに全身的な疾患は認められなかった。そこで、唾液分泌量測定器で唾液分泌量を測定したところ、有意な違い認められた。さらに、両被験者の日常生活を過ごしている中で、実感として「唾液が少ない感じがする」「唾液の量が多いとか少ないとか自覚したことはない」ということが述べられており、主観的にも客観的にも、2つのグループ間で唾液の分泌に関して違いがみられることを確認することができた。

今回の実験結果は、特定の被験者から得られたものであるが、唾液の分泌の良し悪しが細菌叢に影響していた、さらに、抗菌活性でも、分泌が良好な被験者の唾液の方が、高い抗菌活性を示した。このことは、すべての被験者ではないものの、細菌叢および抗菌活性を調べることで、口腔内の環境を評価することができるということが示唆された。

E. 結論

今年度、唾液の分泌量の異なる2つのグループで、唾液中の細菌叢および唾液による抗菌活性を調べたところ、サンプル数は少ないものの、唾液の分泌が良好な被験者では、検出された細菌数が少なく、抗菌活性も高いという傾向が認められた。今後、被験者を増やして詳細に検討していく予定である。

図1 唾液分泌良好群の1例（被験者 #4）
血液寒天培地にて唾液 1/10000 希釈

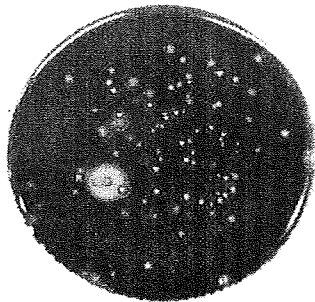


図2 唾液分泌不良群の1例（被験者 #1）
血液寒天培地にて唾液 1/10000 希釈



図3 唾液分泌良好群の1例（被験者 #4）
血液寒天培地にて唾液 1/1000 希釈

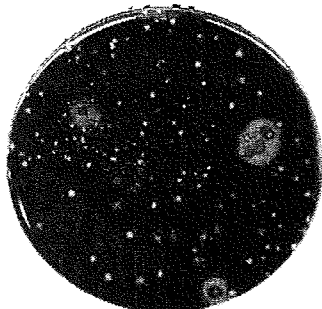


図4 唾液分泌不良群の1例（被験者 #1）
血液寒天培地にて唾液 1/1000 希釈

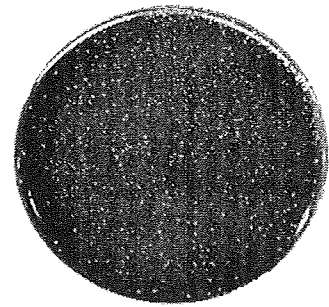
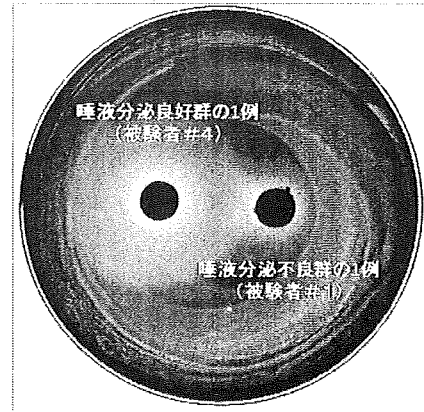


図5 *S. mutans*に対する唾液の抗菌効果



新しい刺激唾液採取法を用いた刺激唾液流出量測定値と口腔内現症の関連

研究分担者 小関 健由 東北大学大学院歯学研究科

口腔保健発育学講座予防歯科学分野

研究代表者 柿木 保明 九州歯科大学摂食機能リハビリテーション学分野

研究要旨

口腔内を潤す唾液は多くの口腔環境を規定する機能を持つ。中でも食事などの刺激時に分泌される刺激唾液は漿液性で、自浄作用・溶解味覚作用・消化作用・排泄作用・緩衝作用・再石灰化作用を担うと考えられる。本研究では、この刺激唾液流出量を規定する因子を解析した。

住民一般健康診査の会場に併設して節目者 179 名を対象とした歯周疾患健診を実施した。この歯周疾患健診の受診者に、キシリトール 100%ガムを用いた改良刺激唾液採取法を用いて刺激唾液流出量を計量した。

刺激唾液流出量に対する単相間に関しては、年齢階級、処置歯数、喪失歯数は有意な負の相関、健全歯数が有意な正の相関、性別の有意な関連を示した。同様に安静時唾液流出量に関しては、年齢階級、処置歯数、喪失歯数、最大 CPI 値、CPI が 3 と 4 の部位数は有意な負の相関、健全歯数が有意な正の相関、性別の有意な関連を示した。唾液流出量に関する線型回帰からは、刺激唾液流出量に関しては、性別、年齢階級、舌苔の厚さ、健全歯数が、安静時唾液では、性別、年齢が有意に流出量を規定していることが示された。

本研究からは齲蝕に関わる指標が刺激唾液流出量と関連する因子として選出され、刺激唾液の齲蝕予防における役割を示すことが考えられ、一方で、安静時唾流出量は、刺激唾液で有意な単相間がみられた項目の他にも、歯周疾患罹患状況とも有意な関連があることが示された。

A. 研究の目的

口腔内を潤す唾液は多くの口腔環境を規定する機能を持つ。即ち、湿潤作用・自浄作用・溶解味覚作用・消化作用・抗菌採用・排泄作用・緩衝作用・再石灰化作用などである。中でも食事などの刺激時に分泌される刺激唾液は漿液性で、自浄作用・溶解味覚作用・消化作用・排泄作用・緩衝作用・再石灰化作用を担うと考えられる。即ち、食事と行った口腔の機能でも最も重要な活動時には、摂食行為が口腔環境を大きく変えることになるが、刺激唾液を大量に分泌することによって、いち早く恒常性を保てる口腔内環境に戻し、

食物を嚥下して消化しやすい様に食塊を整える

。この働きは、生命活動の基本となる食活動を支えるので、刺激唾液の大きな役割と考えられる。本研究では、この刺激唾液流出量を規定する因子を解析するために、昨年度に引き続いてデータを収集して解析した。

B. 研究対象および方法

昨年度に引き続き、宮城県の農業地帯に位置する小規模な市で、住民一般健康診査の会場に併設して、40, 50, 60, 70 歳の節目者 179 名を対象とした歯周疾患健診を実施した(表 1)。この歯周疾

患健診の受診者で、実験の説明を行い同意書を頂いた方を対象に、キシリトール 100%ガムを用いた改良刺激唾液採取法を用いて刺激唾液流出量を計量した。即ち、キシリトール 100%ガム (XYLITOL シュガーレス・アップルミント、オーラルケア社製) を用い、唾液採取容器として、吐唾が容易であること、採取した唾液性状観察が容易である半透明の容器であること、内容量を読み取る詳細な目盛の印刷から、50mL のディスプレイの遠心管 (91050、TPP 社製) を使用し、口腔内の唾液を嚥下した後に口腔にガムを入れて 3 分間咀嚼して、口腔内に貯留する唾液を飲み込まずに遠心管に吐き出して刺激唾液を採取した。同時に歯周疾患検診の結果と合わせて、現在の刺激唾液流出量と口腔内現症との関連を検索した。解析は本年度と昨年度の 2 年分のデータ 333 名分を用いた。検索には SPSS(Ver.15、SPSS 社)を用いた。本研究は、東北大学大学院歯学研究科倫理専門委員会の承認を得て実施した(承認番号 19-25, 19-26)。

C. 研究結果

刺激唾液流出量 (本年度データと昨年度データの統合データ)、及び安静時唾液流出量 (昨年度の研究結果を再解析) に関して、口腔内の状態との関連を検索した。各口腔内状態の指標と唾液流出量の Spearman の相関係数を求めると、印を付けた項目に有意な相関を示した (表 2)。刺激唾液流出量に対する単相間に関しては、年齢階級、処置歯数、喪失歯数は有意な負の相関、健全歯数が有意な正の相関、性別の有意な関連を示した。同様に安静時唾液流出量に関しては、年齢階級、処置歯数、喪失歯数、最大 CPI 値、CPI が 3 と 4 の部位数は有意な負の相関、健全歯数が有意な正の相関、性別の有意な関連を示した。口腔内指標の歯数に関しては、年齢と共に変化するので、唾液流出量に関する線形回帰を実施した。従属変数を唾液流出量、独立変数を口腔内指標をしてステップワイズ法にて検索した。刺激唾液流出量に関しては、最終的に性別・年齢階級・舌苔の厚さ・

健全歯数が有意に流出量を規定していることが示された (表 3)。一方、安静時唾液に関しては、性別・年齢が有意に流出量を規定していることが示された。

D. 考察

口腔内環境を規定する第一番目の因子として唾液が挙げられる。安静時唾液は食事時以外は常に口腔内を潤し様々な口腔内の疾病・傷害の予防を担い、さらに刺激唾液に関しては、生命維持のための食活動を支えて口腔組織を守り、食餌による口腔内環境の変化を緩衝している。即ち、刺激唾液の疾病予防作用は、自浄作用・抗菌採用・緩衝作用・再石灰化作用といった齲蝕予防に対してより注目すべきであろう。本研究からは齲蝕の罹患状態と刺激唾液流出量は、齲蝕に関わる指標と有意な単相間を示し、さらに、年齢、性別、舌苔の厚さ、健全歯数が刺激唾液流出量を規定する因子として選出され、刺激唾液の齲蝕予防における役割を示している。よって、刺激唾液は、自浄作用・抗菌採用・緩衝作用・再石灰化作用などを持つので、齲蝕予防の機能を持つことが考えられ、健康な口腔環境を整える重要な働きを持つことが示された。一方で、安静時唾液流出量は、刺激唾液で有意な単相間がみられた項目の他にも、歯周疾患罹患状況とも有意な相関があることが示された。歯周疾患予防の場合は、歯垢の付着状況がその病態の進行に大きく影響するので、口腔内環境を規定して抗菌作用を示す安静時唾液流出量が低下すると、その影響が現れやすくなるのかもしれない。安静時唾液流出量の線形回帰では、年齢と性別以外に流出量を規定する因子を抽出できなかったが、歯周疾患は多因子が関与する疾患であり、一方で唾液流出量の測定は現時点の体調を反映しているので、全身状態を評価しないと日常的な状態を正確に反映しない可能性が考えられる。

E. 結論

安静時唾液と刺激唾液の流出量は、口腔内疾病

の罹患状況と関連する。即ち、安静時唾液は歯周 能性が示された。
 疾患と、刺激唾液は齶蝕の罹患状況と関連する可

表 1. 刺激唾液と安静時唾液を解析した被験者の分布

年齢階層	刺激唾液		計	安静時唾液		計
	男	女		男	女	
～29歳	0	1	1	12	11	23
30～34歳	11	13	24	3	10	13
35～39歳	2	2	4	2	21	23
40～44歳	9	16	25	8	36	44
45～49歳	3	3	6	15	47	62
50～54歳	17	30	47	18	45	63
55～59歳	1	9	10	17	50	67
60～64歳	34	63	97	30	59	89
65～69歳	12	21	33	43	77	120
70～74歳	26	42	68	58	77	135
75～79歳	5	5	10	35	44	79
80～84歳	4	2	6	12	17	29
85歳～	1	1	2	3	3	6
計	125	208	333	256	497	753
				(不明)		136
				総計		889

表 2. 安静時唾液、及び、刺激唾液流出量と口腔内因子との相関

項目	安静時唾液分泌量	刺激唾液分泌量
年齢	-0.256 ** (756)	-0.129 * (333)
性別	-0.102 ** (755)	-0.343 ** (333)
健全歯数	0.213 ** (768)	0.212 ** (333)
未処置歯数	-0.026 (773)	0.068 (333)
処置歯数	0.145 ** (772)	-0.232 ** (333)
喪失歯数	-0.259 ** (773)	-0.121 * (333)
最大CPI	-0.099 * (680)	-0.018 (329)
CPIが3と4の部位数	-0.113 ** (682)	-0.026 (333)
舌苔(厚さ)	-0.028 (761)	-0.041 (331)
舌苔(広がり)	-0.030 (761)	-0.029 (331)
口臭値(Breathtron値)	0.036 (747)	0.057 (333)

表 3. 口腔疾病因子が関わる刺激唾液流出量の線形回帰

モデル集計 従属変数: 刺激唾液分泌量				
モデル	R	R ² 乗	調整済み R ² 乗	推定値の 標準誤差
1	.366(a)	0.134	0.132	2.540
2	.398(b)	0.159	0.153	2.508
3	.418(c)	0.175	0.167	2.488
4	.433(d)	0.188	0.177	2.472

a. 予測値: (定数)、性別。

b. 予測値: (定数)、性別、年齢階層。

c. 予測値: (定数)、性別、年齢階層、舌苔厚さ。

d. 予測値: (定数)、性別、年齢階層、舌苔厚さ、健全歯数。

係数 従属変数: 刺激唾液分泌量						
モデル		非標準化係数		標準化係数	t	有意確率
		B	標準誤差	β		
1	(定数)	10.531	0.493		21.348	0.000
	性別	-2.060	0.291	-0.366	-7.079	0.000
2	(定数)	11.982	0.681		17.607	0.000
	性別	-2.065	0.287	-0.367	-7.186	0.000
	年齢階層	-0.170	0.056	-0.156	-3.053	0.002
3	(定数)	12.462	0.702		17.763	0.000
	性別	-2.202	0.290	-0.392	-7.588	0.000
	年齢階層	-0.155	0.056	-0.142	-2.779	0.006
	舌苔厚さ	-0.470	0.187	-0.130	-2.508	0.013
4	(定数)	11.235	0.888		12.658	0.000
	性別	-2.033	0.298	-0.362	-6.816	0.000
	年齢階層	-0.125	0.057	-0.115	-2.201	0.028
	舌苔厚さ	-0.447	0.187	-0.124	-2.398	0.017
	健全歯数	0.053	0.024	0.120	2.234	0.026