

## 論文の内容の要旨

氏名：小野 仁徳

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Fundamental study on prevention of *Candida albicans* infection in elderly persons using antimicrobial substance in saliva

（唾液中抗菌物質を用いた高齢者の *Candida albicans* 感染予防に関する基礎的研究）

肺炎は日本人の死因の第3位を占め、肺炎で亡くなる人の95.3%が高齢者である。高齢者の肺炎で発生頻度も死亡率も高い誤嚥性肺炎は、肺炎球菌の他に、口腔内や義歯上にバイオフィルムを形成する口腔内常在菌および真菌を含む唾液などが気道に流入することによって発症する。疫学調査から、徹底したプラークコントロールを中心とした口腔ケアが、誤嚥性肺炎の予防として重要な役割を果たすことが示されている。義歯表層に形成されたバイオフィルムはデンチャープラークと呼ばれ、真菌の *Candida albicans* (*C.albicans*) が主体となり形成される。一般的にデンチャープラークは機械的および化学的な洗浄方法で除去することが推奨されている。しかし、様々な義歯の洗浄方法や口腔ケアが提唱されているものの、誤嚥性肺炎の患者数は依然として減少傾向を示していないのが現状である。従って、高齢者を対象とした *C.albicans* などの誤嚥性肺炎起因微生物に対する感染予防の確立は重要な課題となっている。

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  $\beta$ -defensin 3, histatin 5 および IgA などがある。そこで本研究は、抗菌物質の唾液中の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、唾液試料を用いた検査の基礎的検討を試みた。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  $\beta$ -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、唾液採取の至適時間を決定することを目的とし、3つの抗菌物質の変動を検討した（研究1）。さらに、*C.albicans* に対する唾液中抗菌物質の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* に対する感染防御能の指標に関する知見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2）。

研究1は  $\beta$ -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常者20名（男性10名、女性10名、平均年齢25.7 ± 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（EC16-019）。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。 $\beta$ -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。その結果、IgA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、 $\beta$ -defensin 3 および histatin 5 は有意な差を認めなかった ( $p=0.58$  および  $p=0.70$ )。

研究2は、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  $\beta$ -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。使用真菌は *C.albicans* ATCC 90028 を Brain Heart Infusion (BHI) 寒天培地に培養し、実験に使用した。各抗菌物質の濃度は研究1より得られた結果より異なる濃度（最大濃度・中央濃度・最小濃度） [ $\beta$ -defensin 3 (233.8・24.3・2.4 ng/ml), histatin 5 (114.1・12.3・1.1  $\mu$ g/ml)] を選択した。それぞれ recombinant mouse beta-defensin 3 (R&D Systems, MN, USA) および histatin 5 (PEPTIDE INSTITUTE, Osaka, Japan) を上記濃度に希釈して使用した。

吸光度およびコロニー数から作成された検量線を参考に、菌数調整を行い、菌培養液 (*C.albicans* のコロニー算定は  $1.0 \times 10^8$ , ATP 活性実験では  $1.0 \times 10^8$  CFU/ml をコントロールとした) を用意した。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、経時的な抗菌効果を見るために① 10倍希釈法による真菌数のコロニー算定、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* の抗菌物質に対する感受性を検討した。真菌数および ATP 活性は、混和した直後 (0 h)、混和後 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h および 6 h 経過後に測定を行った。感受性試験は、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。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。

真菌数の経時的な変化において  $\beta$ -defensin 3 は有意な差は認めないが, 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( $p=0.003$ )。

ATP 活性値の経時的な変化において  $\beta$ -defensin 3 は経時的に ATP 活性値が増加する傾向を示した( $p=0.050$ )。Bonferroni 法の結果, 最大濃度の  $\beta$ -defensin 3 とコントロールとの間に 6 時間経過時の ATP 活性値の比較において有意な差を認めた( $p=0.007$ )。一方で, histatin 5 は有意な差を認めないが, 経時的に ATP 活性値が減少する傾向を示した( $p=0.051$ )。

$\beta$ -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 ( $p<.0001$ ), 中央濃度 1.000 ( $p<.0001$ ), 最小濃度 0.998 ( $p<.0001$ )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 ( $p=.002$ ), 中央濃度 0.907 ( $p=.002$ ), 最小濃度 0.900 ( $p=.002$ )となり, 正の相関を示した。感受性試験において  $\beta$ -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.  $\beta$ -defensin 3, histatin 5 および IgA の有意な日間変動は認めなかった。
3. 研究 1 の結果から, *C.albicans* に対する感染防御能を個人レベルで把握するため, IgA が低値を示した午前中に唾液採取を行う事が望ましい。
4. 研究 2 の結果から, 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。