

学 位 論 文 題 名

Relationship between salivary histatin 5 levels and
Candida CFU counts in healthy elderly

(健康的な高齢者における唾液中の histatin 5 の濃度とカンジダ数との関係)

学位論文内容の要旨

[背景]

カンジダ菌 (*Candida albicans*) は人体に広く存在する真菌である。口腔内のカンジダ菌は、高齢者の場合、唾液とともに気道に吸引されておこる誤嚥性肺炎や免疫力低下時に日和見感染として認められる口腔カンジダ症のリスクファクターである。また、義歯を使用することで義歯がリザーバーとなり、カンジダ菌数が増加することが報告されている。

一方、唾液特有のタンパク成分であるヒスタチンは、現在まで 12 種類報告されており、ヒスタチン 1, 3, 5 が総ヒスタチンの 80%以上を占めている。ヒスタチンの代表的な機能として、カンジダ菌に対する強力な殺菌作用があり、生理濃度内で濃度依存的そして pH 依存的にも発芽阻止、殺菌作用を示すことが報告されている。しかし、ヒスタチン 5 のカンジダ菌に対するこれらの作用は *in vitro* で確認されているものの、疫学的に確認した研究は少ない。

本研究では、高齢者から採取した唾液中のヒスタチン 5 の濃度とカンジダ菌数との関係を検討した。

[対象および方法]

道内の農村地区において、町が主催した住民健康診断を受診した高齢者で、問診等から自立した生活が送れていると判断された高齢者 124 名（男性 60 名、女性 64 名、平均年齢 75.1 歳、65～91 歳）を対象とした。

口腔内診査（義歯の種類、残存歯数、歯周疾患重症度）に引き続いて唾液を採取した。歯周疾患の重症度は Community Periodontal Index を指標として代表歯 10 歯について診査した。義歯の診査では、上下顎それぞれ全部床義歯、局部床義歯の有無を記録した。

唾液の採取では、あらかじめ唾液採取前 90 分間はブラッシング、飲食を禁止するよう事前に依頼し、安静時唾液を各自 5 分間かけて冷蔵した滅菌容器に採取した。採取した時間帯は午前 8:30 から 11:00 の間であった。採取した唾液は、直ちに貯蔵庫に保管し、2 時間以内に実験室に運搬した。唾液中のカンジダ菌数を測定するために、希釈した唾液 0.1 mL を寒天平板(直径 90 mm, CHROMagar Candida, Paris)上に塗布し、37 °C、48 時間で好氣的に培養した。カンジダ菌数は、寒天平板上のカンジダ菌のコロニー数を計測し、対数変換した値 (log CFUs/ml) として求めた。

唾液中ヒスタチン 5 量は競合 ELISA 法により測定し、唾液中蛋白 1 mg 当りの重量 (μg)で表した。抗体でコーティングされたプレート (固相化抗体) に対して、50 μl の試料と 50 μl の酵素標識抗原を加えて、室温で 30 分間反応させた。その後、300 μl 洗浄溶液を加える過程を 5 回繰り返した。100 μl の o-phenylenediamine (OPD)を加え、室温で 15 分間放置することで発色反応を起こし、2N 硫酸を 100 μl を加えて反応を終了させ、吸光度(OD)は 492 nm で計測した。唾液中蛋白は蛋白定量用キット (BIO-RAD, Hercules, CA)で測定した。

統計分析においては、平均値の差の検定には対応のない t 検定、一元配置分散分析を用いた。多重比較は Scheffe' の multiple comparison test で行った。ヒスタチン濃度とカンジダ菌数との相関関係は Spearman の順位相関係数より求めた。また、カンジダ菌数に対する要因をみるために、年齢、性別、histatin 5 濃度、義歯使用の有無を独立変数、カンジダ菌数を従属変数とした重回帰分析を行った。

[結果および考察]

1)無歯顎者は 27 名であり、平均残存歯数は 13.0 ± 9.5 本であった。32 名は上下顎ともに義歯を使用してなく (義歯未使用者群)、51 名は上下顎の少なくともどちらかに局部床義歯を使用しており (局部床義歯使用者群)、41 名は上下顎の少なくともどちらかに全部床義歯を使用していた (全部床義歯使用者群)。CPI コードの分布では、現在歯数が少ないが故に「成立しない」と判定された者が最も多く 35 名 (28.2%)、次いでコード 2 (23.4%)、コード 3 (19.4%)の順であった。

2) 104 人の唾液試料(84%)が、カンジダコロニー形成陽性であった。スコットランドの調査 (137 名の高齢者中 88%) やブラジルでの調査 (77 名の高齢者中 84.4%) と比較しても大きな差はなく、本調査集団が特殊な集団を対象であるとはいえない。カンジダ菌数の平均値を年齢別、性別、義歯の使用群別に検討したところ、70~79 歳 (1.79 ± 1.11 , $p < 0.01$), 80~91 歳 (1.88 ± 1.08 , $p < 0.05$)の高齢者は、65~69 歳の高齢者(0.99 ± 0.92)と比較して、有意に高い唾液中カンジダ菌数を示した。男女間に差は認められなかった。局部床義歯使用者群の唾液中(1.96 ± 0.97 , $p < 0.001$), 全部床義歯使用者群の唾液中(1.95 ± 1.08 , $p < 0.001$)には、義歯未使用者群 (0.78 ± 0.92)よりも有意に高いカンジダ菌数を示した。

3) ヒスタチン濃度とカンジダ菌数との相関関係をみたところ、80~89 歳の高齢者群 ($p < 0.05$), および全部床義歯使用者群 ($p < 0.01$) の唾液中では有意な負の相関が認められた。しかし、その他の年齢層や、男性のみ、あるいは女性のための群では有意な相関は認められなかった。

4)重回帰分析の結果、唾液中カンジダ菌数は、ヒスタチン 5 の濃度と有意な負の関連を、また義歯の使用と有意な正の関連を示した。

しかし、今回は、口腔衛生状態や義歯の清掃に関する情報、薬剤の使用状況が調査されていない。また、カンジダ性口内炎と診断できる高齢者がみられなく、実際のカンジダ性口内炎とヒスタチン 5 濃度との関連が調査できなかった。これらの点については、今後の改善点であると考えられる。

[結論]

ヒスタチン 5 濃度が低く、義歯の床面積が大きくなると、唾液中のカンジダ菌数が増加した。また、高齢者に対してヒスタチン 5 は、口腔内におけるカンジダ菌の感染をコントロールする因子の 1 つである可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 森 田 学
副 査 教 授 井 上 農夫男
副 査 教 授 柴 田 健一郎
副 査 講 師 兼 平 学

学 位 論 文 題 名

Relationship between salivary histatin 5 levels and Candida CFU counts in healthy elderly

(健康的な高齢者における唾液中の histatin 5 の濃度とカンジダ数との関係)

[背景]

口腔内のカンジダ菌は唾液とともに誤嚥され肺炎の病原体となる他、高齢者の口腔カンジダ症のリスクファクターでもある。また、義歯を使用することで義歯がリザーバーとなりカンジダ数が増加することが報告されている。

唾液タンパクであるヒスタチンは、カンジダ菌に対する強力な殺菌作用を示すことが報告されているが、カンジダ菌に対するこれらの作用を疫学的に確認した研究は少ない。

本研究では、高齢者から採取した唾液中のヒスタチン 5 の濃度とカンジダ菌数との関係を検討した。

[対象および方法]

道内の農村地区において、町が主催した住民健康診断を受診した高齢者で、問診等から自立した生活が送れていると判断された高齢者 124 名（男性 60 名、女性 64 名、平均年齢 75.1 歳、65～91 歳）を対象とした。

口腔内診査に引き続いて唾液を採取した。歯周疾患の重症度は CPI を用いた。義歯の診査では、上下顎それぞれ全部床義歯、局部床義歯の有無を記録した。

唾液の採取では、あらかじめ唾液採取前 90 分間はブラッシング、飲食を禁止するよう事前に依頼し、安静時唾液を各自 5 分間かけて冷蔵した滅菌容器に採取した。採取した時間帯は午前 8:30 から 11:00 の間であった。採取した唾液は、直ちに貯蔵庫に保管し、2 時間以内に実験室に運搬した。唾液中のカンジダ菌数を測定するために、希釈した唾液 0.1mL を寒天平板(直径 90mm、CHROMagar Candida, Paris)上に塗布し、37℃、48 時間で好氣的に培養した。カンジダ菌数は、寒天平板上のカンジダ菌のコロニー数を計測し、対数変換した値 (log CFUs/ml)として求めた。

唾液中ヒスタチン 5 量は競合 ELISA 法により測定し、唾液中蛋白 1mg 当りの重量(μg)で表した。抗体でコーティングされたプレート（固相化抗体）に対して、50μl の試料と 50μl の酵素標識抗原を加えて、室温で 30 分間反応させた。その後、300μl 洗浄溶液を加える過程を 5

回繰り返した。100 μ l の o-phenylenediamine (OPD)を加え、室温で 15 分間放置することで発色反応を起こし、2N 硫酸 100 μ l を加えて反応を終了させ、吸光度(OD)は 492nm で計測した。唾液中蛋白は蛋白定量用キット(BIO-RAD, Hercules, CA)で測定した。

統計分析においては、平均値の差の検定は t 検定、一元配置分散分析を用いた。多重比較は Scheffe' の multiple comparison test で行った。ヒスタチン濃度とカンジダ菌数との相関関係は Spearman の順位相関係数より求めた。また、カンジダ菌数に対する要因をみるために、重回帰分析を行った。

[結果および考察]

1) 32 名は上下顎ともに義歯を使用してなく（義歯未使用者群）、51 名は上下顎の少なくともどちらかに局部床義歯を使用しており（局部床義歯使用者群）、41 名は上下顎の少なくともどちらかに全部床義歯を使用していた（全部床義歯使用者群）。CPI コードの分布では、現在歯数が少ないが故に「成立しない」と判定された者が最も多く 35 名(28.2%)、次いでコード 2(23.4%)、コード 3(19.4%)の順であった。

2) 104 人の唾液試料(84%)が、カンジダコロニー形成陽性であった。カンジダ菌数の平均値を年齢別、性別、義歯の使用者別に検討したところ、70～79 歳(1.79 ± 1.11 , $p < 0.01$)、80～91 歳(1.88 ± 1.08 , $p < 0.05$)の高齢者は、65～69 歳の高齢者(0.99 ± 0.92)と比較して、有意に高い唾液中カンジダ菌数を示した。男女間に差は認められなかった。局部床義歯使用者群の唾液中(1.96 ± 0.97 , $p < 0.001$)、全部床義歯使用者群の唾液中(1.95 ± 1.08 , $p < 0.001$)には、義歯未使用者群(0.78 ± 0.89)よりも有意に高いカンジダ菌数を示した。

3) ヒスタチン濃度とカンジダ菌数との相関関係をみたところ、80～89 歳の高齢者群($p < 0.05$)、および全部床義歯使用者群($p < 0.01$)の唾液中では有意な負の相関が認められた。しかし、その他の年齢層や、男性のみ、あるいは女性のための群では有意な相関は認められなかった。

4)重回帰分析の結果、唾液中カンジダ菌数は、ヒスタチン 5 濃度と有意な負の関連を、また義歯の使用と有意な正の関連を示した。

[結論]

ヒスタチン 5 濃度が低く、義歯の床面積が大きくなると、唾液中カンジダ菌数が増加した。また、高齢者に対してヒスタチン 5 はカンジダ菌の感染をコントロールできる可能性が示唆された。

本論文申請者に対して、主査および副査からまず本論文の概要についての説明が求められた。続いて行われた口頭試問において、カンジダ菌数は、加齢とともに変化するものであるのか、または、義歯を入れることで変化するものであるのか、CPI の具体的な測定方法、ヒスタチンの抗菌作用機序、そして、今回の疫学調査の結果から今後の研究方針をどのように考えているか等、詳細にわたって行われた。

申請者はこれらの設問に対しそれぞれ適切な回答を行った。従って申請者は研究の立案と実行、結果の収集とその評価について、十分な能力があることが理解され、本研究に直接関係する事項のみならず、予防歯科学および疫学全般にわたり広い学識を有していると認められた。また本研究は、唾液中のヒスタチン 5 濃度とカンジダ菌数との関係を疫学的に調査したものであり、今後のヒスタチン 5 の臨床応用の可能にする重要なものであり、予防歯科学の領域において大いに貢献したと評価された。従って、本論文申請者は博士（歯学）にふさわしいものと認められた。