

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 永田俊彦, 米田 哲	-----	41
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 佐藤 勉	-----	45
3. 唾液検査による歯周病スクリーニング精度の向上 野村義明	-----	51
4. 血清歯周病抗体価とCOPD増悪との関連性 ー歯周病合併により COPD増悪は増加する?ー 寺田邦彦, 室繁郎, 伊藤穰, 三嶋理晃	-----	57
5. Potential Benefits of Serum IgG Antibody Titer against Periodontal Bacteria in the Prognosis for Periodontitis Recurrence Noriko Sugi, Koji Naruishi, Fumio Myokai, Hideo Arai, Kyoko Katsuragi-Fuke, Takayuki Kono, Fusanori Nishimura, Shogo Takashiba	-----	63

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する。

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  $\geq 1$  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  $\geq 1$  の検体を Pi に対する血清抗体陽性と定義した。Aa Y4, Aa 29523, Aa 67 のうちいずれかが検査値  $\geq 1$  の検体を Aa に対する血清抗体陽性と定義した。Ec 検査値  $\geq 1$  の検体を Ec に対する血清抗体陽性と定義した。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



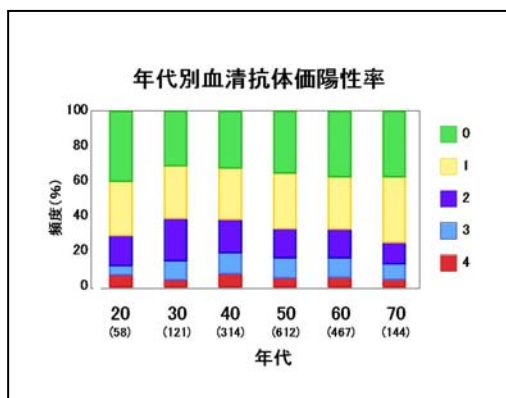
## 体価の関連性の検討

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）。



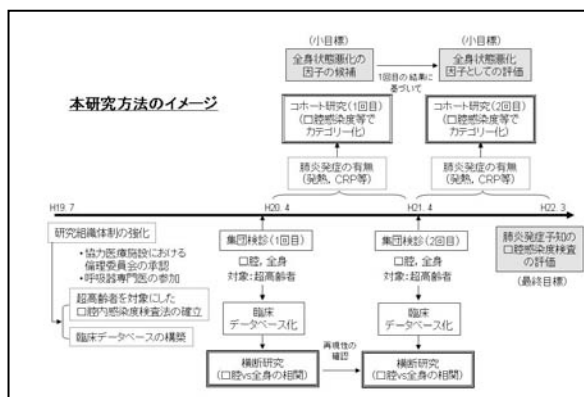
### C-2. 高齢者肺疾患の病態と血清 IgG 抗体価の関連性

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

氏名 ( )

Date	1月5日	1月6日	1月7日	1月8日	1月9日	1月10日	1月11日
日付 Date	day 1	day 2	day 3	day 4	day 5	day 6	day 7
アセスメント							
口腔状態							
歯肉：赤							
白苔：有							
舌苔：黄							
舌苔：紫							
口腔	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥
粘膜	発赤	発赤	発赤	発赤	発赤	発赤	発赤
潰瘍							
嚥下	正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常
唾液	量	量	量	量	量	量	量
粘稠度	正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常
口唇	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥
亀裂							
口腔ケア	実施	実施	実施	実施	実施	実施	実施
ケア方法	歯ブラシ	歯ブラシ	歯ブラシ	歯ブラシ	歯ブラシ	歯ブラシ	歯ブラシ
ケア回数	1回	1回	1回	1回	1回	1回	1回
ケア時間	5分	5分	5分	5分	5分	5分	5分
ケア担当者	看護師	看護師	看護師	看護師	看護師	看護師	看護師
サイン	医師	医師	医師	医師	医師	医師	医師

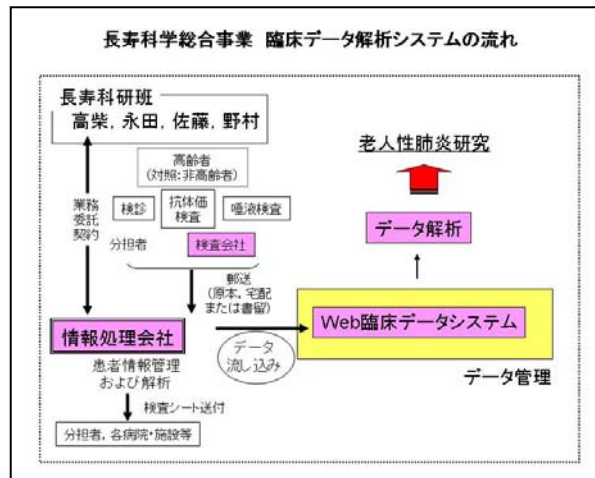
重要であると考え、患者の口腔内の状況、口腔乾燥、口腔粘膜のびらんなどに適応する条件として、①口腔粘膜に傷をつくらない、②患者自身が操作しやすい、そして③

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、含嗽剤を軽く口を含む程度にする。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は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。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, Kokeyuchi 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<sup>®</sup>, 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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液

Buffer B : 0.2 mol/l NaHCO<sub>3</sub> 水溶液

##### ① 抗原調整液

Buffer A (12 ml) + Buffer B (25.5 ml) + H<sub>2</sub>O (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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g (2g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 2.9g (29g), KCl 0.2g (2g), NaN<sub>3</sub> 0.2g (2g), Tween 20 0.5ml (5ml) を H<sub>2</sub>O 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 MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.1 g を H<sub>2</sub>O で 800 ml 溶解した。

更に Diethanolamine buffer 9.7ml, NaN<sub>3</sub> 1.2 g を加え, 全量 H<sub>2</sub>O 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<sub>2</sub>O 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。

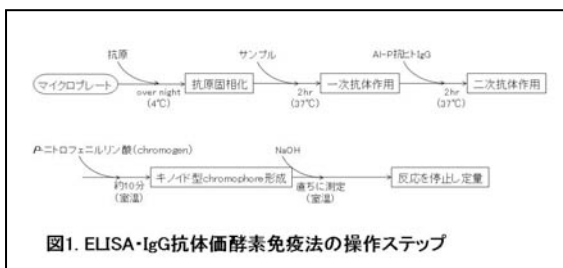
② パラニトロフェニルリン酸 : 140 mg を diethanolamine 140 ml で溶解した。

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  $\mu\text{l}$  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. 抗原のコートニング：抗原調整液 11 ml に抗原液 110  $\mu\text{l}$  を溶かし、ELISA プレート (Greiner) の各 well に 100  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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) =

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

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 (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

**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
-----	----	-----	-----

**血清IgG抗体価**

Aa	Ec	総IgG
P.g	P.i	

**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



**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

**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
初回検診時のデータを転用



<input type="checkbox"/> 疫学研究	<input type="checkbox"/> ヒトゲノム・遺伝子解析研究	<input checked="" type="checkbox"/> 臨床研究等
<b>倫 理 審 査 申 請 書</b>		

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（全施設名を列挙又はリストを添付）
- 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)	工藤直英子
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差別化できる(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増量して)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 1.0 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（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

財団法人江原積善会積善病院・院長・高橋 茂  
財団法人江原積善会積善病院・歯科医長・小林 芳友

(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



(2-1) 撤回の意思表示後試料等は廃棄する

(2-2) 撤回の意思表示後試料等は廃棄しない

理由： 連結不可能匿名化されている

廃棄しないことで個人情報明らかになるおそれが極めて小さい

その他 ( )

## 2) 被験者のプライバシー及び個人情報の保護に関する対策

(1) 被験者への説明場所： 外来  病棟  研究室  ( )

(2) 同意書・試料等の保存方法：

鍵のかかるロッカー（ロッカー等設置場所：歯学部棟 7 階の岡山大学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研究室内）

その他 ( )

(3) 電子化されたデータの保管方法

パスワード等で制御されたコンピュータ（PC 等設置場所：歯学部棟 7 階の岡山大学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教授室内）

その他 ( )

## 3) インフォームド・コンセント（※出版公表原稿の場合は該当しないが(11)の項目のみ記載すること）

(1) 被験者（患者・健常者）への説明書・同意書： あり（別途添付）  なし

(2) 被験者（患者・健常者）へ説明する者：

岡山大学の研究者  他施設の共同研究者  その他（具体的に： )

(3) 研究に参加した場合の被験者の受ける利益・不利益

利益  あり  なし （どちらの場合も以下に内容を記載）

内容：診断マーカーに使える可能性があるものの、そもそも本研究結果によって実証するものであるため、実際の診断・診察において現時点では利益は生じない。

不利益  あり  なし （どちらの場合も以下に内容を記載）

内容：サンプル採取のために行う採血の際に若干の疼痛を感じるようになるものの、すべて熟練した医療従事者によって実施されるので激しい疼痛になることはない。また診療時間以外にサンプル採取のための時間を要するが、数分程度で終了できるので、これについても大きな不利益は生じない。

危険性  あり  なし （どちらの場合も以下に内容を記載）

内容：研究遂行のために提供される血液や口腔細菌は、熟練した医療従事者によって採取されるので危険性は非常に少ないと考えられ、その時の患者の体調にも十分配慮して行うことを徹底する。

(4) 研究に参加しなかった場合の被験者の受ける利益・不利益

利益  あり  なし （どちらの場合も以下に内容を記載）

内容：研究への参加の同意は、患者の自由な意思によって決定される。同意の如何に関わらず、診療内容を含むすべての医療行為は変化しないので、患者に何らかの利益が生じることはない。

不利益  あり  なし （どちらの場合も以下に内容を記載）

内容：研究への協力の同意は、患者の自由意思で決定される。同意されなくても、診療内容等を含むすべてにおいて、不利益が生じることはない。

(5) 研究目的で採取した試料（資料）の解析結果の本人及び家族への開示等

(5-1) 本人への開示等

原則として開示  希望者に開示  開示しない（理由： )

(5-2) 家族等（遺族を含む）へ開示等

原則として開示  本人の同意を条件として開示

希望者に開示  開示しない（理由： )

(6) 特許権等知的財産権の帰属先： 岡山大学又は研究者

□その他 ( )

(7) 研究成果の公開

■ (7-1) 研究成果は公開する

(7-1-1) 公開の方法: ■論文発表 ■学会発表 ■インターネット掲載 □その他 ( )

(7-1-2) 個人情報保護

■公開の際に被験者の個人情報を匿名化する

■連結不可能匿名化

□連結可能匿名化

連結可能匿名化する場合の理由

□公開の際に被験者の個人情報を匿名化しない

匿名化しない場合の理由:

□ (7-2) 研究成果は公開しない

(8) 研究終了後の試料等の保存

■ (8-1) 承諾を得た試料等について保存する

(8-1-1) 保存が必要な理由: 患者から得られた試料は, 将来の新規の研究課題においても活用できるので, 保存しておくことに医学的な貢献度が大きいと考えられる。

(8-1-2) 保存方法: ■情報(データ)として保存 ■試料(血液・唾液等)そのものを保存  
□その他 ( )

(8-1-3) 保存時の匿名化の種類: □連結不可能匿名化 ■連結可能匿名化 □匿名化しない  
□その他 ( )

匿名化しない場合の理由:

■ (8-1-4) 保存した試料等を当初承諾を得た研究以外の研究に使用する際は, 本学倫理委員会に改めて申請し, 承認を得るとともに, 被験者の同意を得る

現時点で予想される, 当初承諾を得た研究以外の研究の内容: 特になし

■ (8-1-5) 保存場所

■岡山大学(具体的な保存場所: 歯学部棟 7 階の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の研究室 ■施錠可能 □施錠不可能)

■共同研究施設(具体的な保存場所: 各施設の検査室 ■施錠可能 □施錠不可能)

□ (8-2) 試料等はすべて廃棄する

研究終了後の試料等を廃棄する場合の方法

□ (8-2-1) オートクレーブ滅菌後焼却 □ (8-2-2) シュレッダーにて裁断

□ (8-2-3) その他 ( )

(9) 外部検査機関等への委託

■ (9-1) 外部検査機関等へ検査等を委託する

(9-1-1) 外部委託機関名及び所在地

① (株) リージャー長崎ラボラトリー, 〒854-0065 長崎県諫早市津久葉町 62-22  
(血清抗体価の測定)

② (株) サンスター, 〒569-1195 大阪府高槻市朝日町 3-1 (データの解析)

③ (株) BML, 〒151-0051 東京都渋谷区千駄ヶ谷 5-21-3 (唾液検査)

(9-1-2) 外部へ委託する試料の匿名化の種類:

■連結不可能匿名化(電子化データ) ■連結可能匿名化(血清および唾液)

□匿名化しない

匿名化しない場合の理由:

□ (9-2) 外部検査機関等へ検査等を委託しない

(10) 試料等を細胞・遺伝子・組織バンクに登録する予定

□ (10-1) 試料等を細胞・遺伝子・組織バンク等へ登録する

(10-1-1) 登録施設名及び所在地

(10-1-2) 登録試料の匿名化の種類：  連結不可能匿名化  連結可能匿名化

匿名化しない

匿名化しない場合の理由：

■ (10-2) 試料等を細胞・遺伝子・組織バンク等へ登録しない

(11) インフォームド・コンセントを必要としない理由 (出版公表原稿の場合のみ記載)

#### 4) 代諾者

■ (1) 代諾者を置く

(1-1) 代諾者を置かなければならない理由：研究の対象が超高齢者になるので、認知症などの理由によって、研究者との直接的な意思疎通が困難な場合が想定される。

(1-2) 被代諾者の種類

未成年 ( 20 歳未満 16 歳以上  16 歳未満)

その他 ( )

未成年であっても 16 歳以上の場合には代諾者とともに本人の理解も得る。

■ 認知症等で本人の意思が確認できない成人

死者

その他 ( )

(1-3) 代諾者の選定 (該当者を選択)

■ 後見人 ■ 保佐人 ■ 親権者 ■ 配偶者 ■ 成人の子 ■ 成人の兄弟姉妹もしくは孫

祖父母 ■ 同居の親族又はそれらの近親者に準ずると考えられる者

その他 ( )

(2) 代諾者を置かない

#### 5) 本研究の実施によって発生する損害に対する補償の有無

(1) あり

補償の内容：

■ (2) なし

### 9 その他

#### 1) 研究資金

(1) 公的資金等： ■ 運営費交付金 ■ 委任経理金  産学連携等研究費

■ 科学研究費補助金 (種目：厚生労働科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業))

その他 ( )

(1-1) 資金提供先との間に起こりうる利害の衝突及び研究者等の関連組織との関わり

あり : 具体的説明

■ なし

(2) 被験者の費用負担

■ (2-1) あり

■ 保険診療の範囲内  全額自己負担 (負担額： ) 円)

一部自己負担 (負担額： ) 円)  その他 ( )

(2-2) なし

#### 2) 高度先進医療への申請予定

(1) あり 申請予定時期： 年 月頃

■ (2) なし

#### 3) 緊急連絡先

研究実施担当者

所属：岡山大学 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

電話番号：086-235-6675

e-mail：stakashi@cc.okayama-u.ac.jp

# 「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」 に関する全国等共通プロトコール

## 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差別化できる(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. 研究の実際

### 1) 研究対象

(1)具体的対象者：高齢者

(2)対象人数：1,000 名

(3)対象者種別：

岡山大学医学部・歯学部附属病院を受診する外来高齢患者

上記以外の施設（施設名：各共同研究機関）を受診する外来高齢患者

上記以外の施設（施設名：各共同研究機関）に入院・入所中の高齢者

(4)対象者年齢：高齢者（70 歳以上）

### 2) 研究の手法等

**サンプル採取部位：**血液および唾液

**口腔内診査：**残存歯数、歯周組織検査、舌苔の付着度、口腔粘膜上皮片の残存度、口腔乾燥度など

**全身状態の把握：**日常生活動作、発熱頻度、日和見感染由来の肺炎発症診断

**高齢者における口腔内細菌叢の解析(細菌検査)：**高齢者の唾液を採取して細菌叢を解析する。細菌の解析は、歯周病原性細菌・緑膿菌などの他に真菌も対象として行い、各細菌から抽出した DNA サンプルを変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) や定量 PCR 法を組み合わせる。また、高齢者の臨床的な検査(口腔内局所および全身状態)も同時に調査し、残存歯数、歯周疾患の程度などが口腔細菌叢に与える影響を把握する。研究の対照として、若年層・中高年層における各部位における細菌叢についても同時に調べ、高齢者に特徴的に見られる細

菌叢を解析する。なお、無歯顎高齢者の口腔細菌叢も解析する（検査会社に外注予定）。

**高齢者における歯周病原性細菌に対する血清IgG抗体価の測定(感染度検査):**歯周病原性細菌に対する血清抗体価の測定は、ELISA法を用いて我々の研究室でルーチンに行われている手法を用いて行う（真菌に対する血清抗体価の測定は、未だ開発中であるもののELISA法を応用して対処する）。また、確立した抗体価検査システムの信頼度を確認するために、対象とした高齢者層の中でも、残存歯を有する群・無歯顎群に大別して細菌叢を解析することで、とりわけ歯周病原性細菌の感染度が血清抗体価によって反映されるかどうかを検討する（検査会社に外注予定）。

**高齢者における唾液中のLDH活性と遊離Hb値の測定(歯周組織の炎症度検査):**高齢者の唾液中のLDHと遊離Hbを測定して、口腔内の炎症状況を測定する。そして、口腔内細菌叢と口腔細菌に対する血清抗体価との関係を統計学的に解析し、口腔細菌の炎症が口腔感染度によって影響を受けているかどうかを検討する（検査会社に外注予定）。

上記の臨床検査による各被験高齢者の検査値をデータベース化した後、検査項目各々の相関を統計解析する。

**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):**確立した口腔内細菌叢の検査システムを用いて、高齢者の口腔内細菌叢を調べ、全身疾患（肺炎、脳梗塞、心臓疾患および発熱回数）の発症との相関を統計学的に検討し、その臨床的な有用性を評価する。また確立した血清抗体価検査システムを用いて高齢者の口腔細菌に対する血清抗体価を、さらに唾液検査システムを用いて高齢者の口腔組織の炎症度をそれぞれ調べ、同じく、全身疾患（肺炎、脳梗塞、心臓疾患および発熱回数など）の発症との相関を統計学的に検討する。なお、被験高齢者のADLの指標やCRPや発熱状況に関する内科的な検査値の情報も得て、各統計解析法の変数として用いる。老人性肺炎等の医科的な疾患の診断は、共同研究者の京都大学医学部呼吸器内科専門医によって行われる。

**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):**確立した口腔内細菌叢の検査システム（細菌検査および感染度検査）を、口腔細菌感染に起因すると思われる全身疾患（肺炎など）を発症していない高齢者に適用して、細菌学的な口腔内の状態を検査した後の全身感染症の発症の程度を経時的に調べ、その発症予知診断システムの有用性を臨床統計学的に解析する。老人性肺炎等の医科的な疾患の診断は、共同研究者の京都大学医学部呼吸器内科専門医によって行われる。

### 3) 同意を得る方法（説明書、同意書、同意撤回書は、別紙記載のとおり）

主治医が患者に概略を説明し、患者の参加意思を確認した後、研究分担者が出向いて説明文書を示しながら同意を得る。

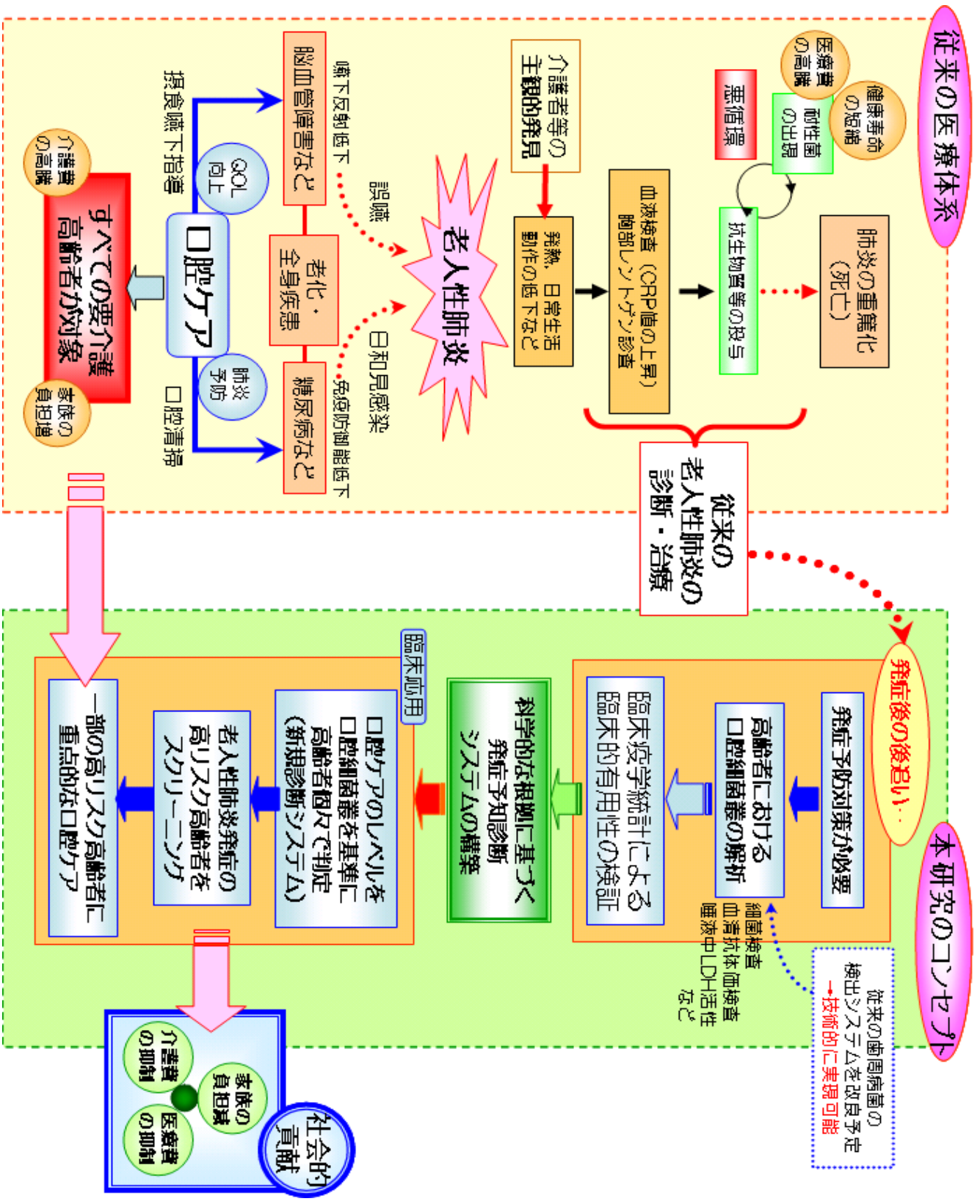
### 4) 費用

(1)公的資金等：運営費交付金、委任経理金、科学研究費補助金（種目：厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業））

(2)患者（被験者）の費用負担：通常の診療経費（医療保険の診療に関わるもの）

## 4. 予想される臨床的意義

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。



# 「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」 に関する説明書

この文書は、患者様に「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」に関する臨床研究へのご協力をお願いするため、その研究内容などについて示したものです。本研究のために、口腔内および全身状態の検査を行い、少量の血液および唾液を提供されることについて、ご同意くださる場合は、担当医師・歯科医師から十分に説明をお聞きになった後、この文書を熟読した上で、同意の表明をお願いいたします。

以下に、本研究の内容に関する事項と研究協力への同意に関して、いくつかの重要な点をご説明させていただきます。お分かりにならないことや疑問点につきましては、何度でも説明させていただきますので、遠慮なく担当医師・歯科医師にお尋ねください。

なお、この研究は岡山大学大学院医歯薬学総合研究科の倫理委員会において、科学的・倫理的妥当性が十分に審査され承認されております。

## (1) 研究協力の任意性

研究への協力の同意は、患者様の自由意思で決定できます。本研究は、実際の歯科治療、口腔ケアの実施には直接に関係しない血液および唾液を試料として用いるものなので、本研究に同意されなくても診療内容等を含むすべてにおきまして不利益が生じることはありません。

## (2) 研究計画

1) 研究題目：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

2) 研究責任者：岡山大学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 教授：高柴 正悟

3) 研究分担者：



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)	工藤値英子
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

4) 共同研究機関: 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 (関連の老人保健施設, 特別擁護老人ホーム等の施設を含む)

5) 研究目的: 口腔内には 500 種類を越える細菌が存在しており, これらが高齢者に見られる老人性肺炎などの全身疾患の発症に影響を与えることが知られています。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るようになってきました。現在, これらの取り組みは, すべての要介護高齢者を対象にしています。しかしながらこのことは, 超高齢社会の我が国の現状から考えると, 家族の身体的負担が増えることはもちろん, ひいては介護費の高騰による保険財政の圧迫を意味するものであり, 効率的な口腔ケアを行うためのシステム整備が必須となります。

我々は, 老人性肺炎の発症における口腔細菌叢の関与の程度を細菌学的に解析することで, 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, その危険度に応じた口腔ケア実施の可能性が見出せるという発想のもと, 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しています。

## 6) 研究方法:

この研究には、患者様の血液と唾液を試料として使用します。実際に口の中に感染している口腔内細菌の量や種類を調べて、その全身症状との関係を検討します。

血液は、1 ml程度を採取して、検査会社（リージャー社長崎ラボラトリー，所在地：〒854-0065 長崎県諫早市津久葉町62-22）にて血清抗体価を測定します。検査結果は、岡山大学内に一括に送付され、コンピュータシステムによって管理されます。

細菌は、唾液から採取し、その細菌の遺伝子を取り出す処理をした後に得られる溶液を試料として保存し、特定の細菌の遺伝子を増やす方法によって、岡山大学で細菌の種類や量を調べます。唾液はその他に、検査会社（BML，〒151-0051 東京都渋谷区千駄ヶ谷5-21-3）にて炎症関連因子の測定に利用します。検査結果は、血液と同じように岡山大学内に一括にまとめられ、大学内のコンピュータシステムで管理されます。

さらに、通常の診療に伴って診査される口腔内の臨床所見（口腔粘膜や歯周組織の状態）および全身状態に関する所見（発熱、誤嚥の有無など）を、患者様のカルテから抽出します。そして、臨床検査データとして、同様に岡山大学内のコンピュータシステムで管理します。データは、岡山大学あるいは共同研究機関（サンスター，〒569-1195 大阪府高槻市朝日町3-1）において統計学的な解析に用いられます。

なお、試料の採取は、経時的に追っていくため3回程度（必要があれば、それ以上、5回程度まで）必要となります。試料の採取は、通常、熟練した医療従事者によって行われるので危険性は非常に少ないと考えられますが、その時の患者様の体調にも十分配慮して行います。

試料は、原則として本研究のみに使用し、研究終了後に廃棄します。血液は、微量なので検査後には残りません。細菌の遺伝子を含む溶液試料は、あなたの同意が得られれば、さらに保存して別の研究に使用させていただく場合もありますが、その際には、改めて倫理委員会の承認を得て、再度患者様の同意をいただきます。

なお、この研究の同意を撤回された場合（後述）には、試料とデータは直ちに廃棄します。

7)研究期間:平成19年8月末(委員会承認日)～平成22年3月31日(3年間弱)

### **(3)患者様にもたらされる利益および不利益**

本研究は、歯周病関連細菌に対する血清抗体価を調べる検査法を確立し、広く臨床応用することを目標と定めているため、直接、患者様にもたらされる利益はありません。得られた研究成果は将来の医学の発展に寄与するものであることをご理解ください。また、この研究は疾患感受性など、各個人の遺伝子の違いを調べるものではなく、個人の遺伝情報(ゲノム)を解析するものでもありません。さらに提供された試料は各個人が特定できないように匿名化しますので、個人の検査結果等の情報等が流出する危険性はありません。

### **(4)個人情報・プライバシーの保護**

試料あるいはデータの管理は匿名化し、コード番号で行います。さらに、そのデータはパスワードで制御された専用のコンピューターで保管され特定の研究者のみが取り扱います。また、学外の検査会社と情報管理会社へ試料あるいはデータが送付される場合には、コード番号により匿名化したものを取り扱います。集められたデータは岡山大学内のコンピュータシステムによって管理されます。このように、患者様の個人情報が外部に漏れることは絶対にならないように十分留意するとともに、プライバシーの保護について細心の注意を払います。

### **(5)研究結果等の開示**

研究の結果は、原則として同意されたご本人のみにお知らせします。希望される場合には、ご家族等(後見人、保佐人、親権者、父母、配偶者、成人の子又は兄弟姉妹等)を交えてお知らせすることもできます。その際、内容についてお分かりになりにくい点がありましたら、遠慮なく担当の医師・歯科医師にお尋ねください。

ただし、結果が解るまでに数か月を要する場合があります。また、この検査で病気の原因等が必ず解るわけではありません。

### **(6)研究成果の公表**

患者様のご協力によって得られた研究の成果は、氏名などが決して明らかにならないようにした上で、学術集会や学術雑誌等で公表されることがあります。

#### **(7) 研究から生じる知的財産権の帰属**

臨床研究の結果として特許権などが生じる可能性があります。その権利は岡山大学に属するため、患者様がこの特許権を持つことはできません。また、その特許権などを基として経済的利益が生じる可能性があります。患者様はこれについても権利がありません。

#### **(8) 研究終了後の試料の取扱い**

提供していただいた検体試料のうち唾液から得られた細菌の遺伝子を含む溶液試料は、もし患者様が同意していただければ、将来の研究のための貴重な試料として、研究終了後も長期間保存させていただきます。将来、この保存試料を新たな遺伝子解析研究を含む医学研究に用いる場合、改めてその研究計画書を倫理審査委員会に提出して承認を得た後に、患者様（その近親者、ご家族を含む）の同意を頂いた上で使用します。

#### **(9) 費用負担等**

この研究に必要な費用の負担を患者様にお願いすることは一切ありませんが、交通費や謝礼金の支給もありません。また、一般診療に要する費用のうち自己負担分については、通常の診療のとおり、患者様に負担していただくことになります。

#### **(10) 同意及びその撤回**

この研究について理解して協力を同意される場合は、別紙の「同意書」に署名してください。

一度同意された場合でも、いつでも撤回することができます。その場合は、担当の医師、歯科医師に口頭で伝え、別紙の「同意撤回書」に署名してください。

なお、研究の協力を断っても、同意を取り消されても、それによって診療上不利になることは決してありません。

## (11) 質問・苦情等の受付先

所属 岡山大学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

電話番号：086-235-6675

e-mail: stakashi@cc.okayama-u.ac.jp

## 同意書

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科長殿

私は「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」について、(所属) \_\_\_\_\_ の担当医師・歯科医師 \_\_\_\_\_ から、別紙「説明書」を用いて詳しい説明を受け、その内容を十分理解しました。今後の医学の進歩のために、次の条件で研究協力を同意します。

I. 説明を受け、下記の項目を理解しました。

- |                       |                    |
|-----------------------|--------------------|
| 1. 研究協力の任意性           | 7. 研究から生じる知的財産権の帰属 |
| 2. 研究計画               | 8. 研究終了後の試料の取扱い    |
| 3. 患者様にもたらされる利益および不利益 | 9. 費用負担等           |
| 4. 個人情報の保護            | 10. 同意及びその撤回       |
| 5. 研究結果等の開示           | 11. 質問・苦情等の受付先     |
| 6. 研究成果の公表            |                    |

II. 上記Iですべての項目ご理解いただいた方は、次をお読みいただき、「はい」または「いいえ」のいずれかに○印をお付けください。

① 提供する試料等が、この研究に使用されることに同意します。

( ) はい ( ) いいえ

② 提供する試料が長期間保存され、将来新たな遺伝子解析研究を含む医学研究に使用されることに同意します。

( ) はい ( ) いいえ

平成 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

(試料提供者) 氏名 \_\_\_\_\_ (自署)

生年月日 明治・大正・昭和 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

住所・連絡先 \_\_\_\_\_

電話番号 \_\_\_\_\_

(ご家族等) 氏名 \_\_\_\_\_ (自署)

生年月日 明治・大正・昭和 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

患者との続柄 \_\_\_\_\_

住所・連絡先 \_\_\_\_\_

(担当医師・歯科医師欄) 本研究に関して、私が説明し同意が得られたことを証します。

氏名 \_\_\_\_\_ (自署)

所属 \_\_\_\_\_

注) 1. 氏名欄には、自署にて記名してください。

2. 担当医師・歯科医師に提出した後、この「同意書」のコピーをお受け取りください。

## 同意撤回書

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科長殿

私は、「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」に関する同意書に署名しましたが、以下の同意を撤回することを、

(所属) \_\_\_\_\_ の担当医師・歯科医師 \_\_\_\_\_ に伝え、ここに同意撤回書を提出します。

該当する項目に○印をお付けください

- ① ( ) 提供する試料等を、この研究に使用することに関する同意を撤回します。
- ② ( ) 提供する試料を保存して他の研究に使用することに関する同意を撤回します。

平成 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

(同意撤回者) 氏名 \_\_\_\_\_ (自署)

生年月日 明治・大正・昭和 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

住所・連絡先 \_\_\_\_\_

電話番号 \_\_\_\_\_

(ご家族等) 氏名 \_\_\_\_\_ (自署)

生年月日 明治・大正・昭和 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

患者との続柄 \_\_\_\_\_

住所・連絡先 \_\_\_\_\_

(担当医師・歯科医師欄) 本研究に関する同意撤回書を、私が受領したことを証します。

氏名 \_\_\_\_\_ (自署)

所属 \_\_\_\_\_

注) 1. 氏名欄には、自署にて記名してください。

2. 担当医師・歯科医師に提出した後、この「同意書」のコピーをお受け取りください。





平成 20 年 1 月 31 日

トヨタ自動車株式会社  
安全健康推進部 主査 岩田全充様

厚生労働省(長寿科学総合研究事業)  
研究代表者 高柴正悟  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
歯周病態学分野 教授  
(代 成石浩司 助教)

## 歯周病検査実施ご協力のお願い

拝啓 寒冷の候、貴社ますますご盛栄のこととお喜び申し上げます。

さて、私どもの研究室におきましては、かねてより歯周病細菌に対する血中の IgG 抗体価を測定することで、患者様の歯周病菌感染度を把握し歯周病診断に活用しております。併せ、この血液検査の重要性につきまして、日本歯周病学会を基盤にして広く社会への提唱・啓蒙を行っております。

つきましては、トヨタ自動車株式会社様に、下記のとおり『**歯周病検査実施**』へのご協力をお願いしたく、一度お目にかかり、コンセプト等を説明させていただく時間を作っていただければと考えております。お忙しいところ、誠に申し訳ございませんが、宜しくご検討の程、お願い申し上げます。

何か不明な点がございましたら、何なりとお尋ねください。

敬具

### 記

#### 《お願い事項》

東京本社での歯科健診時に『**従来の唾液検査と血液検査**』を実施していただきたくお願い申し上げます。

- 時 期： H20 年 4 月～H21 年 3 月まで
- 対 象： 東京本社 社員（受入出向含）約 1000 名
- 費 用： 厚生労働科学研究にて負担
- 検査内容： ①唾液検査：前回（H16 年～H17 年）と同様の実施内容  
②血液検査：少量の血液を検体とする多数を対象にスクリーニングできる簡便な検査

#### 《ご参考》現在の研究 （研究代表者：高柴正悟、岡山大学教授）

1. 文部科学省科学研究費補助金 基盤研究A  
「指尖毛細血管採血による血漿抗体価を用いた歯周病細菌感染度の判定法の研究」
2. 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）」

以上

## 歯周病細菌に対する IgG 抗体価検査について

### 歯周病細菌に対する IgG 抗体価検査の導入目的

現在の歯周病検査は、歯周ポケット深さや歯の動揺度などの歯周組織の破壊の程度を調べる、という側面から行われている。しかしながら、歯周病は口腔細菌の感染症なので、細菌感染（菌の体内侵入）による患者の免疫反応の程度を調べるのが重要である（免疫とは、体外から細菌やウイルスが体内に侵入してきた後に、その細菌などを敵と認識して排除する仕組みのことである）。

免疫系において重要な役割を果たすのは白血球である。大きく分けると、食細胞（好中球やマクロファージ）、ナチュラルキラー細胞（NK 細胞）およびリンパ球（B 細胞や T 細胞）になる。これらの細胞の中で、B 細胞は必要があれば「形質細胞」という細胞に成熟し、いわゆる「免疫グロブリン (Ig)」という抗体を産生する。私たちが実施している血液検査は、歯周病菌に対する血液中の抗体量を測定することで歯周病菌の感染を証明し、病態の把握を行う検査である。私たちは、血中の抗体価は歯周病菌の感染の程度を把握する指標として捉え、現在、一般の歯科医院において実施されている歯周病の検査と併用することで、患者様の歯周病の病態を診断している。

### どのように臨床に組み入れ、活用しているか

#### 一歯周病治療時において一

歯周病菌に対する血清抗体価検査は、歯周病治療にともなって減少し、歯周メンテナンス期には低値で安定する傾向がある（図 1 参照）。この現象は、歯周病治療によって、口腔内の歯周病菌の感染量が確実に減少し、健常レベルで安定している状況証拠になると考えている。

抗体価は、観血的・外科的な処置を行った直後、一時的に上昇する傾向があるので（ブースター効果）、観血処置後、約 3 ヶ月経過してから採血を行うのが合理的である。歯周病治療後のメンテナンス期においては、症状がなく安定している場合でも、約 1 年ごとに採血し抗体価の測定を行うようにしている。この時、抗体価の上昇をみた場合、近々に歯周病再発の可能性があるので、メンテナンスの間隔を狭めたり、より厳密なプラークコントロールを指導するように配慮している。

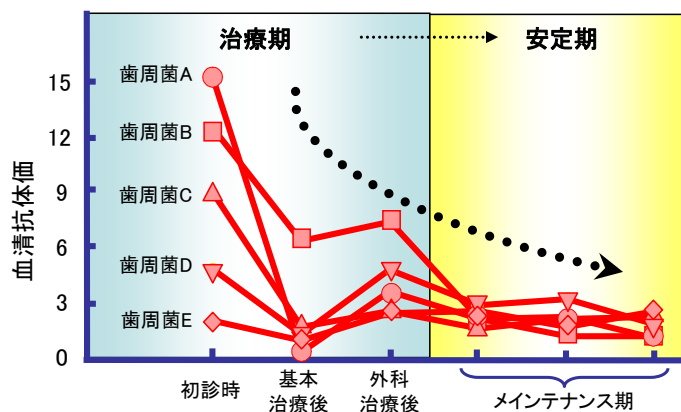


図1 歯周病検査としての血清IgG抗体価の応用

血清抗体価検査は、各々の歯周病細菌に対する口腔内の感染度を示すものである。歯周病の治療期から安定期にかけて抗体価は減少する傾向がある。治療期には治療効果の判定の指標になり、安定期には歯周病再発の予知検査として応用できると考えられる。

—集団歯周病健診において—

歯周病の状態を把握するためにレントゲン撮影や口腔内診査を行うことは、患者様個々を対象とする際には適している（図2）。しかしながら、地域や企業での検診など、“多数”を対象に潜在患者をスクリーニングするためには、被検者の時間的・身体的苦痛の負担が大きいことに加え、必要な時間・施設・器材などの点で実施に困難がある。そこで、私たちは、このような“多数”を対象にしてスクリーニングを行うための簡便な検査として、歯周病菌に対する血中の抗体価測定検査を提唱している。

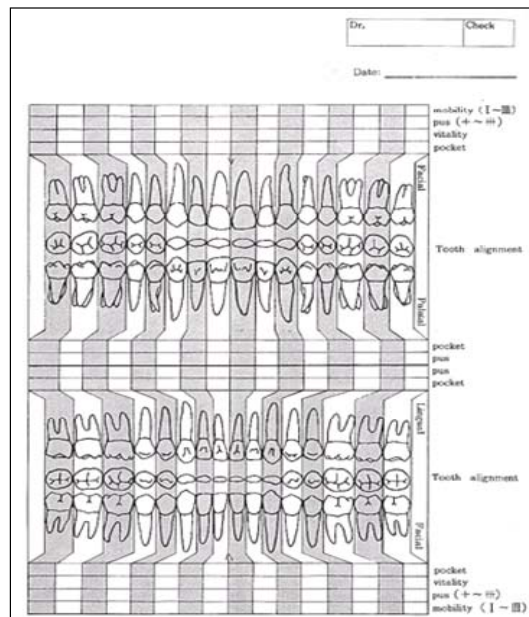


図2. 歯周病検査シート(岡山大学)  
視診では歯周病の有無は分からない。歯周病は、歯周ポケット、歯の動揺など様々な検査項目があるので、集団健診には不向きである。

企業健診で歯周病をスクリーニングするための血清 IgG 抗体価検査の応用（提案）

—企業健診での歯周病患者のスクリーニングを目的とした血清抗体価検査の適用—

前述のとおり、企業健診（人間ドックを含む）に歯周病検査を組み込むことは、その煩雑さのために困難である。我々は、文部科学省の支援のもと、ゲノム医学研究の推進を目的にして発足した大規模な患者集団の DNA・血清バンクであるバイオバンクジャパン保有の歯周病患者血清を用いて、歯周病の臨床症状と歯周病菌に対する血清 IgG 抗体価の統計学的な関連を調べた（図3）。この結果は、歯周病検査としての血清抗体価検査の有用性を示唆するものである。

また、岡山大学で実施している血清抗体価測定法では、歯周病患者の血清 4 μl を PBST 液 12.4 ml に希釈（3,100 倍希釈）したサンプルを 96 well プレートに、100 μl/well の量で添加するのみなので、データの確実性を増すために Duplicate で検査した場合でも、200 μl/1 菌種必要となるだけである（参考の項を参照）。このことは、企業健診等で実施される一般生化学血清検査に追加項目として、歯周病血清抗体価検査を組み込むという提案について、大いに現実性があるものと考えられる。

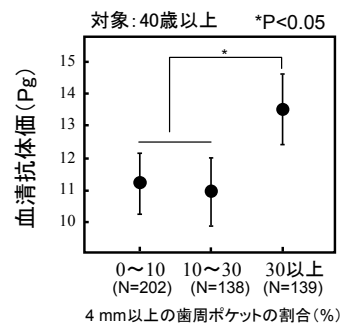


図3. 歯周ポケットの深さと血清抗体価の関係  
血清試料はバイオバンクジャパン（東大医科研）から購入した。歯周病が悪化するとPg菌に対する血清抗体価は有意に増加する。

—スクリーニングした歯周病患者の追跡—

血清抗体価検査は、健診時の上腕静脈からの採血によって実施可能であるものの、やは

り痛みを覚える処置になるので、実際、スクリーニングした歯周病患者の抗体価の推移を追跡することに対して、少なからぬ抵抗を感じる人も多いと予想する。このような場合、我々が提唱している患者負担の少ないデバイスキットを用いて自己採血した（デバイス処理）指尖血漿のIgG抗体価を測定する検査法が有効である。本法は“血漿”を用いることになるものの、静脈血清と指尖血漿との間で歯周病細菌に対するIgG抗体価はほぼ一致することを確認している（図4）。

以上のことから、集団企業健診で「歯周病の可能性あり」との判定を受けた被検者は、企業内の歯科診療室あるいは日本歯周病学会会員関連の大学病院歯周病専門診療科・開業歯科医院などで指尖採血を行い（右写真参照）、それを検査会社に郵送して血漿抗体価の推移を把握するという「歯周病検査」の流れができる（社会への貢献）。

### トヨタ自動車での問題点

1. 本血清抗体価検査は有用であると考えるが、歯科保険においては適応外の検査であるので、広く歯科医療の世界で認知されているものではない。したがって、研究レベルでは世界中で報告されているものの、実際に「健診」に適用されている例はない。このように社会的認知が低い検査に対して、トップ企業としてどのように対応するのが望ましいのか方向性を決める必要がある。
2. 本検査外注はかなり高額になるので、現実面を考慮して、トヨタ自動車内の臨床検査室での適用になるのかもしれない（リージャー長崎ラボラトリーに郵送：5,000円から6,000円予定、4菌種）。血清抗体価検査実施におけるコストを算出すると、岡山大学で実施している血清抗体価検査は、概ね一人1菌種あたり460円(Duplicateテスト)となる（人件費算定せず、参考の項を参照）。この場合、岡山大学で実施しているELISA検査法をトヨタ自動車内で再現できるかどうかを確認する必要がある。

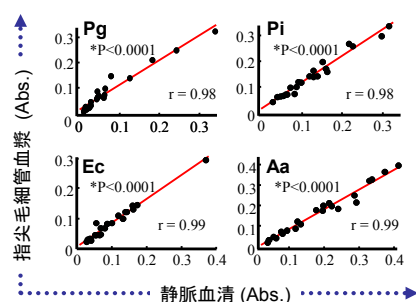


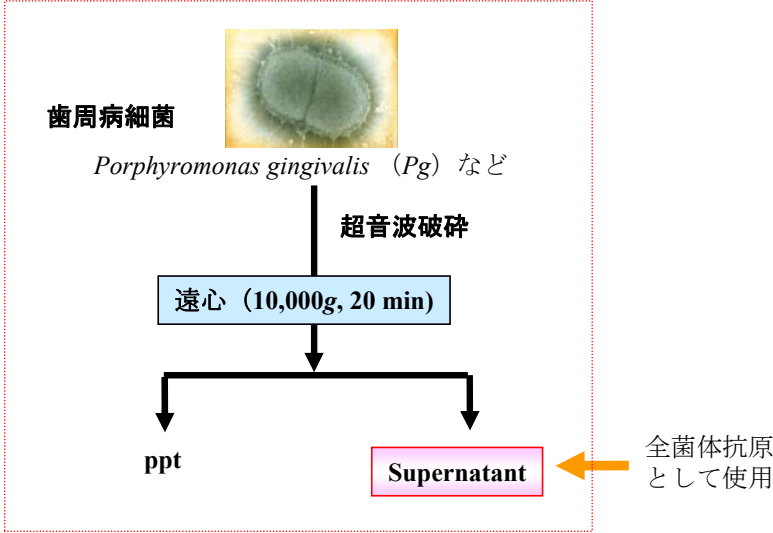
図4.指尖毛細血と静脈血による抗体価の相関  
4菌種に対して、指尖血漿と静脈血清における血清抗体価を測定して、一致度を調べたところ、すべての菌種において、相関係数0.98以上であった。



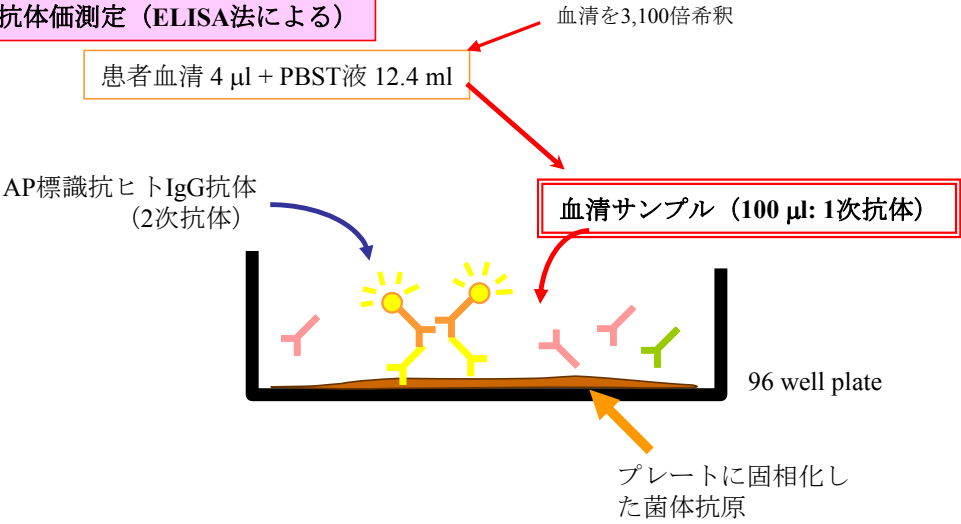
(連絡先) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
歯周病態学分野 教授  
高柴正悟  
stakashi@cc.okayama-u.ac.jp

歯周病菌に対する血清IgG抗体価の測定

歯周病菌体抗原の作製法



血清抗体価測定 (ELISA法による)



データの確実性を増すために3 wellに血清を使用すると、  
→100 µl × 3 well = 300 µl

ELISA(IgG血清抗体価)コスト表

検査工程	使用器具および試薬	メーカー	単価	使用数量	コスト(円)
(準備)(40人/回)					
菌体抗原の調整(13菌種)	PBS-			1.43ml	
	1.5ml用アシストチューブ			13本	
血清の調整					
1.標準血清	1.5ml用アシストチューブ			1本	
2.患者血清	1.5ml用アシストチューブ			40本	
	ブルーチップ			40本	
	ストック用箱			0.5箱	
(血清抗体価の測定)					
[1日目]					
抗原のコーティング	BufferA			12ml	
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>			21.2g	
	BufferB			25.5ml	
	NaHCO <sub>3</sub>			16.8g	
	50ml用チューブ			13本	
	25ml用ロングピペット			1本	
	ELISA用プレート			13枚	
	リザーバー			13個	
	ブルーチップ			13本	
	イエローチップ			104本	
標準血清の調整	FALCON 14mlポリプロピレンチューブ			8本	
	PBST			28.1ml	
	フィンピペット用チップ			1本	
	ブルーチップ			1本	
	イエローチップ			1本	
被験血清の調整	FALCON 14mlポリプロピレンチューブ			40本	
	PBST			12.4ml	
	イエローチップ			40本	
[2日目]					
プレート洗浄	PBST			1497.6ml	
血清のプレートへの添加	イエローチップ			16本	
	ロングチップ			80本	
プレート洗浄	PBST			1497.6ml	
二次抗体の添加	ALP conjugated anti human IgG(H+L)			26 μl	
	25ml用ロングピペット			1本	
	PBST			130ml	
	イエローチップ			8本	
	リザーバー			1個	
プレート洗浄	PBST			1497.6ml	
発色抗体の添加	パラニトロフェニルリン酸ナトリウム			140mg	
	25ml用ロングピペット			1本	
	ジエタノールアミンバッファー			140ml	
	diethanol amine			97ml	
	NaN <sub>3</sub>			1.2g	
	MgCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O			0.1g	
	NaOH			62.4ml	
	リザーバー			2個	
	イエローチップ			16本	
算出金額	PBS-	@@@	60円/10	1.43ml	0.08
	1.5ml用アシストチューブ	@@@	28,875円/500本	63本	3638.25
	ストック用箱	@@@	11,340円/20箱	0.5箱	283.5
	ブルーチップ	@@@	2,940円/1000本	54本	158.76
	イエローチップ	@@@	1,505円/1000本	185本	278.42
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	@@@	1,100円/500g	21.2g	46.64
	NaHCO <sub>3</sub>	@@@	1,050円/500g	16.8g	35.28
	50ml用チューブ	@@@	44,000円/100本	13本	5720
	25ml用ディスプレイピペット	@@@	3,308円/1000本	3本	9.92
	ELISA用プレート	@@@	11,550円/40枚	13枚	3753.75
	リザーバー	@@@	15,750円/200個	16個	1260
	FALCON 14mlポリプロピレンチューブ	@@@	11,970円/500本	48本	1149.12
	PBST	@@@		4534.6ml	
	NaCl	@@@	571円/500g	36.27g	41.42
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	@@@	7,900円/250g	0.9g	28.44
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ・12H <sub>2</sub> O	@@@	840円/500g	13.15g	22.09
	NaN <sub>3</sub>	@@@	6,800円/500g	0.9g	12.24
	KCl	@@@	750円/500g	0.9g	1.35
	Tween20	@@@	2,700円/500g	0.21ml	1.13
	フィンピペット用チップ	@@@	2,700円/75本	1本	36
	ALP conjugated anti human IgG(H+L)	@@@	25,515円/0.5ml	26 μl	1326.78
	パラニトロフェニルリン酸ナトリウム6H <sub>2</sub> O	@@@	2,520円/5g	140mg	70.56
	ジエタノールアミンバッファー	@@@		140ml	
	diethanol amine	@@@	2,310円/500ml	97ml	448.14
	NaN <sub>3</sub>	@@@	6,800円/500g	1.2g	16.32
	MgCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O	@@@	924円/500mg	0.1g	184.8
	NaOH	@@@	605円/500g	62.4ml	0.07
総合計					18523.06

最終データまでのコスト: 18523.06/40人=463.1円/人

# 分担研究報告





厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

徳島周辺における研究協力老人保健施設の確保

分担研究者 永田俊彦<sup>1</sup>  
研究協力者 米田 哲<sup>2</sup>

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・歯周歯内学分野  
<sup>1</sup>教授, <sup>2</sup>助教

本研究は、超高齢者における老人性肺炎の発症予知因子として有用な検査項目を疫学的手法によって捉えることを目的に実施されるものである。したがって、研究に協力可能な多数の超高齢者を確保することが重要である。本年度は、研究協力老健施設を確保することを第一命題と設定し、徳島大学関連の複数の施設に協力を依頼した。その結果、15施設から承諾を得ることに成功し、その予備調査を行ったところ、入所・入院者は合計1,000名を超えることが分かった。介護状態も自立した方から胃婁で寝たきりの方まで様々で、介護老人における多様な病態がうかがえた。また、施設の看護スタッフへの聞き取りより熱発の既往のある老人が多数存在していることも確認できた。さらに、口腔内も無歯顎の方から残存歯数が20本を超える方までがいることが確認できた。以上のことから、来年度以降、本年度作成した検診票による超高齢者の検診を行う体制が整備された。このことは、本研究の遂行に大きく貢献できるものと思われる。

A. 研究目的

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ている。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、要介護高齢者の口腔清掃の手法だけでなく摂食嚥下指導に至るまで範囲を広げた取り組みが行われるようになった。しかしな

がら、これらの取り組みは、一部の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、将来的にはすべての要介護高齢者を対象とする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。

そこで、老人性肺炎の病態形成における口腔細菌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。

## B. 研究方法

岡山大学を主管校として複数の歯学部等が連携したマルチセンター方式の研究を行うこととし、研究参加予定の機関によるミーティングが昨年6月に行われた。その際、我々、徳島大学は主として老健施設に入所している要介護高齢者を対象として以下の調査を行うこととなった。

### 1) 口腔内診査

残存歯の清掃状態、歯石付着の程度、ポケットプロービングデプス計測およびポケット計測時出血

### 2) 日常生活診査

喫煙の有無、口腔ケアの有無、介護状態の調査（自立または要介護給付）、食事摂取の状態（普通食、軟食、流動食）

### 3) 全身状態調査

氏名、性別、年齢、身長、体重、全身基礎疾患、肺炎の既往の有無。また、調査期間内における熱発の有無。

### 4) 検体採取

市販の指尖微量血液採取システム（リージャー社、〒103-0027 東京都中央区3-2-14）を用い静脈血を約100 $\mu$ l採取し、血漿を分離回収する。この血漿を用いて歯周病関連細菌の血清抗体価計測を行う。

唾液は無糖ガムを咀嚼してもらい、分泌した唾液を回収したものをサンプルとする。唾液から細菌を分離し、細菌種の

特定および量の計測を行う。

検体採取は調査開始時に行い、開始後1年経過時に再度行う予定である。

これら調査を行うにあたり岩田歯科医院（院長：岩田利光 所在地：〒762-0006 坂出市旭町1-1-17）と共同研究を行うこととし、調査を行う老健施設等を確保することとなった。

## C. 研究結果

岩田歯科医院と共同で本研究に協力を得られる施設を確保した。確保した施設は以下の通りである。

1. 社会福祉法人福寿会 特別養護老人ホーム 松林荘（〒761-2204 高松市綾川町山田下山王435-4）
2. 医療法人社団仁泉会 介護老人保健施設 鮎の里（〒761-1706 高松市香川町川東上150-1）
3. 医療法人社団仁泉会 介護老人保健施設 渡の里（〒761-1703 高松市香川町浅野2061）
4. 高松地区広域市町村圏振興事務組合 養護老人ホーム ひぐらし荘（〒761-1703 高松市香川町浅野1414）
5. 医療法人社団伸萌会 介護老人保健施設 ハピネス（〒761-8004 高松市中山741-1）
6. 社会福祉法人国分寺福祉会 特別養護老人ホーム たちばな荘（〒769-0104 高松市国分町新名2081-2）
7. 社会福祉法人永世会 特別養護老人

ホーム 愛生園(〒762-0021 坂出市西庄町大屋敷 79-1)

8. 社会福祉法松寿会 介護老人保健施設 松寿荘(〒762-0015 坂出市大屋富町 3100-26)
9. 社会福祉法人多度津福社会 特別養護老人ホーム 桃陵苑(〒764-0017 仲多度郡多度津町西港 127-3)
10. 居宅介護支援事業所プランナー 介護付有料老人ホーム ネムの木(〒763-0092 丸亀市川西町南字岸ノ上甲 258-1)
11. マエダメディカルコーポ 介護付有料老人ホーム フラワーガーデン京町(〒762-0001 坂出市京町 3-6-56)
12. 医療法人 ひかり会 河内病院(〒764-0033 仲多度郡多度津町青木 130-1)
13. 社会福祉法人三野福社会 介護老人保健施設 みの荘(〒767-0031 三豊市三野大見乙 91-8)
14. 坂出市立病院(〒762-0031 坂出市文京町 1-6-43)
15. 医療法人社団社 まえだ整形外科外科医院(〒762-0007 坂出市室町 3-1-13)

本年度は以上 15 施設で予備調査を行った。その結果、入所・入院者は合計 1,000 名を超え、介護状態も自立した方から胃婁で寝たきりの方まで様々で、介護老人における多様な病態がうかがえた。また、施設の看護スタッフへの聞き取りより熱発の既往のある老人が多数存在していることも確認できた。さらに、口腔内も無歯顎の方から残存歯数が 20 本を超える方

までがいることが確認できた。

#### D. 考察および結論

本年度は本研究に参加する老健施設等の確保と、入所・入院者の予備調査までで終了している。入院・入所者の全てに本研究に参加していただくことにより、多様な病態を示す症例のサンプルおよびデータを収集でき、本研究の遂行に大きく貢献できるものと思われる。

来年度は本研究プロトコールに基づいてサンプルとデータ収集を各施設にて行う予定である。

#### E. 健康危険情報

特に記載事項なし。

#### F. 研究発表

特に記載事項なし。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

特に記載事項なし。



厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

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

分担研究者 佐藤 勉

日本歯科大学生命歯学部・衛生学講座・准教授

平成 19 年度は、研究対象となる高齢者の一部について、おもに口腔細菌叢 (*Candida* sp. を含む、以下同様) および生活習慣に関する調査を実施した。具体的には、自立高齢者 20 名および要介護高齢者 52 名について、唾液を検体とした口腔細菌の検出および生活習慣調査を行った。また、要介護高齢者については、服薬状況についても調査した。その結果、自立高齢者からは 18 菌種、要介護高齢者からは 20 菌種が検出された。検出率が高かったのは自立高齢者、要介護高齢者ともに好気性菌では *Candida* sp. と *Haemophilus parainfluenzae*, 嫌気性菌では *Prevotella melaninogenica* と *Capnocytophaga* sp. であった。また、自立高齢者、要介護高齢者ともに好気性菌に比べ嫌気性菌で検出率が高いものも多く認められた。1 人あたりの検出菌種数は自立高齢者で  $3.1 \pm 1.5$ 、要介護高齢者で  $3.3 \pm 1.7$  であり、両者に有意な差はみられなかった。口腔清掃習慣については、自立高齢者では「1 日 2 回以上歯を磨く者」が 50 % でもっとも多く、要介護高齢者では全対象者が食後に介助者によってガーゼを用いた口腔内清拭を受けていた。要介護高齢者における薬剤の服用状況は、全ての対象者が 1 種類以上の薬剤を日常的に服用していた。服用率をもっとも高い薬剤は便秘薬 (50.0 %) で、次いで催眠鎮静剤 (38.5 %), 口渇性薬剤 (30.1 %), 血管拡張剤 (28.8 %) の順であった。

#### A. 研究目的

2006 年における我が国の老年人口 (65 歳以上) 割合は 20.8 % であり、超高齢社会へと突入した<sup>1)</sup>。こうしたことから、高齢者に対する保健・医療対策は極めて重大かつ急務である。厚生労働省の人口動態統計によると、1980 年以降 65 歳以上の高齢者では肺炎による死亡が全死因の第 4 位となっているが、直接死因としては肺炎および感染症が半数を占めるとの報告もみられる<sup>2)</sup>。さらに、肺炎で死亡する人のおよそ 92 % が 65 歳以上の高齢者であ

ることが示されている<sup>3)</sup>。また高齢者や要介護高齢者にみられる肺炎では、嚥下性肺炎が高い割合を示していることから<sup>4,5)</sup>、その対策は高齢社会における重要課題の一つになってきている。肺炎の起炎細菌として *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* などが知られている<sup>6)</sup>。これらの細菌は口腔常在菌としてみられる場合も多いことから、嚥下性肺炎の発症と口腔細菌との関連が調べられている<sup>7-9)</sup>。

弘田ら<sup>10)</sup>は特別養護老人ホーム入所者

を対象に、5 か月間にわたり口腔ケアを実施し、咽頭からの総細菌数、レンサ球菌数およびブドウ球菌数の変動を観察した。その結果、歯科医師と歯科衛生士による口腔ケアは、いずれの細菌数も減少させたことから、専門家による積極的な口腔ケアは口腔感染症の予防のみならず、呼吸器感染症を含む種々の全身感染症の発症をも軽減させる可能性を示している。米山ら<sup>11)</sup>は同じく特別養護老人ホームに入所している要介護高齢者に対して2年間の口腔ケアを実施し、その前後における肺炎発症率を比較した。その結果、口腔ケア後では発熱および肺炎の発症率が低下し、肺炎予防における口腔ケアの効果を明らかにしている。

Margaretら<sup>12)</sup>は55歳以上の358名について、肺炎発症と医・歯科学的リスクファクターとの関連性を調べた。9年間の追跡調査期間に50名が肺炎を発症しており、種々のリスクファクターに対するロジスティック回帰モデルを用いた分析を行った結果、口腔健康状態の改善が肺炎の発症率低下をもたらすことを示している。さらに泉福ら<sup>13)</sup>は要介護高齢者において、寝たきりの程度と口腔起炎菌の検出状況との関連性を明らかにし、*Klebsiella pneumoniae*や*Pseudomonas sp.*を指標とした口腔ケアの重要性を報告している。このような研究結果は、要介護高齢者における口腔起炎菌の適切なコントロールが肺炎予防を始めとする健康管理に効果的であることを示している。

一般に高齢者は、老化や種々の全身性疾患を有する機会が多いことから感染に対する防御機能が低下していると考えられる。すなわち、高齢者における口腔ケアは介護の必要性の有無にかかわらず重要となってくる。従来、要介護高齢者の好気性細菌や真菌を調べた報告はみられるが、介護を必要としない自立高齢者を

対象とした研究は少ない。特に嫌気性細菌にも着目し、自立高齢者と要介護高齢者における検出状況を同時に比較した報告はみることができない。

本研究では、自立高齢者と要介護高齢者の口腔における好気および嫌気性細菌(*Candida sp.*を含む、以下同様)の感染状況を把握する目的で、起炎菌を中心に検出を試みた。同時に生活習慣についても調査した。

## B. 研究方法

### 1. 対象者

自立高齢者は埼玉県某村在住の65歳以上の男女計20名(男11名、女9名)で、年齢は66~83歳(平均年齢72.7±5.2歳)であった。要介護高齢者は東京都内の老人病院または特別養護老人ホームに入院/入所している男女52名(男12名、女40名)で、年齢は65~93歳(平均年齢75.4±8.2歳)であった。要介護の程度は対象者全員が「準寝たきり状態」であった。本研究を実施するにあたって、対象者や介護者に対して研究内容の十分な説明を行い、同意を得た。

### 2. 口腔細菌の検出

口腔細菌検出の検出は唾液を検体として行った。唾液の採取は、滅菌綿棒(シードスワブ1号、栄研)を口に含ませ、これに唾液を十分にしみ込ませることにより行った。その後直ちに、付属の検体保存輸送用培地に移した。検体採取後6時間以内に以下に示す各種培地を用いて、5% CO<sub>2</sub> 培養および嫌気培養(AnaeroPack・ケンキ、三菱ガス化学)を開始した。①コロンビア5%ヒツジ血液寒天培地〔Nippon Becton Dickinson Company (BD)〕、②BTB培地(BD)、③チョコレートII寒天培地(BD)、④OPAブ

ドウ球菌寒天培地 (BD), ⑤PASA 培地 (BD), ⑥ブルセラ血液寒天培地 (栄研), ⑦サブロー培地 (BD)

24~48 時間の初代分離培養を行った後, コロニーを釣菌し, 以下に示す確認培地および同定キットを用いて, 起炎菌を中心に目的菌の同定を行った。①MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) および MSSA (methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*): PS ラテックス (栄研)・ウサギプラズマ (栄研)・MRSA スクリーニング培地 (BD), ②*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* および他のグラム陰性桿菌: VITEK [bioMerieux vitek Japan (BVJ)], ③β 溶連菌: セロアイデンストレプトキット (栄研)・rapid ID32 strep API (BVJ), ④*Streptococcus pneumoniae*: 肺炎球菌鑑別用ディスク/タキソ P ディスク (BD)・ストレプト (BVJ), ⑤*Haemophilus influenzae*: ヘモフィルス ID4 分画 (BD), ⑥*Candida sp.*: カンジダチェック (ヤترون)

### 3. 生活習慣

対象者の生活習慣に関して, 本調査では口腔清掃習慣と要介護高齢者の薬剤服用状況を調査した。薬剤は成分や使用目的から分類し, 副作用の項目に口渇が記載された薬剤は別に口渇性薬剤として掲げた。

### 4. 統計学的解析

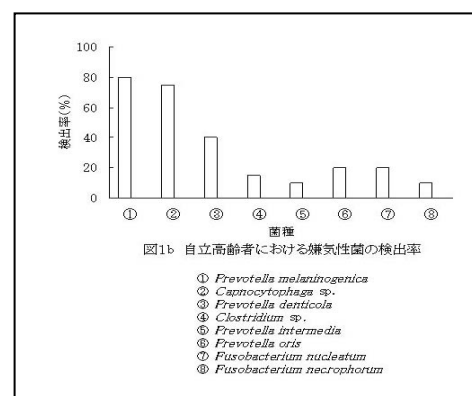
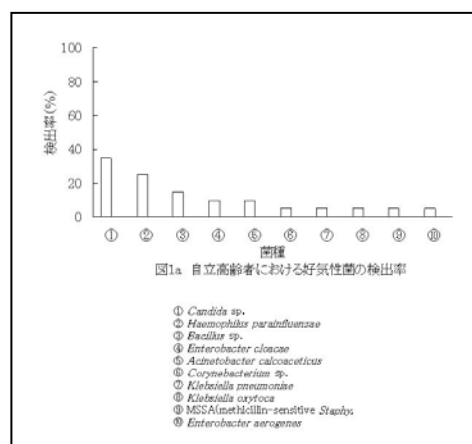
平均値の差の検定には *t* 検定, 微生物の検出率の比較には割合の差の検定を行い, 危険率 5% を基準に有意差有りと判定した。

## C. 研究結果

### 1. 口腔細菌の検出

#### 1) 自立高齢者

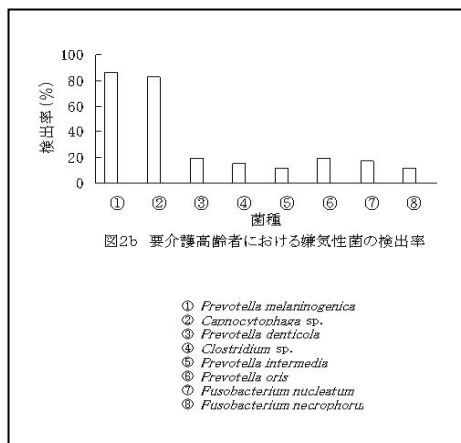
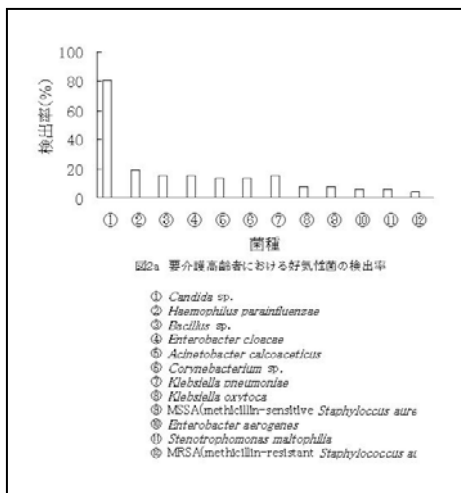
自立高齢者の口腔細菌の検出結果を図 1 (a と b) に示した。検出菌種数は好気性菌が 18 種, 嫌気性菌が 20 種であった。検出率が高かったのは, 好気性菌では *Candida sp.* (35.0 %) と *Haemophilus parainfluenzae* (25 %), 嫌気性菌では *Prevotella melaninogenica* (80.0 %) と *Capnocytophaga sp.* (75 %) であった。また, 好気性菌に比べ嫌気性菌で検出率が高いものが多く認められ, 1 人あたりの検出菌種数は自立高齢者で  $3.1 \pm 1.5$  であった。



#### 2) 要介護高齢者

要介護高齢者の口腔細菌の検出結果を図 2 (a と b) に示した。検出菌種数は好気性菌が 12 種, 嫌気性菌が 8 種であった。検出率が高かったのは好気性菌, 嫌気性

菌ともに自立高齢者と同様に前者では *Candida* sp. (80.8 %) と *Haemophilus parainfluenzae* (19.2 %), 後者では *Prevotella melaninogenica* (86.5 %) と *Capnocytophaga* sp. (82.7 %) であった。また, 好気性菌に比べ嫌気性菌で検出率が高いものが多く認められ, 1人あたりの検出菌種数は  $3.3 \pm 1.7$  であった。なお, 1人あたりの検出菌種数については自立高齢者と要介護高齢者との間に有意な差はみられなかった。



## 2. 生活習慣関連

### 1) 口腔清掃習慣

口腔清掃習慣については, 自立高齢者では全員が 1日1回以上の歯磨きを自分

自身で行っており, 2回実施しているものが半数を占めていた(表1)。要介護高齢者では全員が介助者によるガーゼを用いた口腔内清拭を毎食後に受けていた。

表1 自立高齢者の歯磨き習慣

歯磨き回数/日	人数
1回	7
2回	10
3回	2
4回以上	1

### 2) 薬剤の服用状況

要介護高齢者における薬剤の服用状況の調査結果を表2に示した。全ての対象者が1種類以上の薬剤を常用しており, 服用率がもっとも高かったのは便秘薬(50.0%)で, 次いで催眠鎮静剤(38.5%), 口渇性薬剤(30.1%), 血管拡張剤(28.8%)の順であった。

表2 要介護高齢者の薬剤服用率(複数回答)

薬剤	人数	%
糖尿病剤	2	3.8
不整脈用剤	2	3.8
利尿剤	7	13.5
降圧剤	6	11.5
血管拡張剤	15	28.8
強心剤	3	5.8
他の中枢神経系用薬	6	11.5
抗パーキンソン剤	5	9.6
催眠鎮静剤	20	38.5
神経系用剤	11	21.1
抗てんかん剤	2	3.8
鎮痛、去痰剤、気管支拡張剤	5	9.6
消化器管用薬	4	7.7
健胃消化剤	4	7.7
消化性潰瘍剤	5	9.6
便秘薬	26	50.0
解熱鎮痛消炎剤	6	11.5
消化酵素剤	4	7.7
アレルギー用薬	2	3.8
他の血液、体液用薬	2	3.8
ビタミンA、D剤	7	13.5
ビタミンB1、B6、B12剤	5	9.6
カラム剤	2	3.8
高脂血症用剤	5	9.6
陽イオン交換樹脂剤	2	3.8
口渇性薬剤	16	30.1

## D. 考察および結論

ヒトの口腔内には 350 種にも及ぶ細菌



をはじめとする微生物が生息し、口腔微生物叢を構成している<sup>14)</sup>。これら微生物のなかで齶蝕や歯周疾患の発症や進行に関連するものについては、その性状や病原性等がかなり明らかにされている。

近年、口腔と全身の健康との関連が注目されており、口腔細菌についても全身性疾患との関わりが検討され始めている<sup>5-7)</sup>。なかでも、高齢者や要介護高齢者で高い死亡率がみられる嚥下性（誤嚥性）肺炎の発症に口腔細菌が関与しているとの報告は多い<sup>3, 4-6, 15)</sup>。こうした研究成果をふまえ、高齢者や要介護高齢者に対する口腔ケアは、単に嚥下性肺炎予防のためだけでなく、全身の健康面からも重要であり、さらにはQOLの向上につながっていくものと認識されるようになってきた<sup>10, 11)</sup>。

従来、要介護高齢者における嚥下性肺炎について、口腔の好気性細菌や真菌に関する疫学調査が行われているが、嫌気性細菌や自立高齢者について同時に調べた研究はみることが出来ない。そこで、我々は自立高齢者および要介護高齢者の口腔細菌叢を比較検討する目的で、歯垢や舌苔を検出用検体とした研究を行ってきた<sup>16-19)</sup>。本研究ではこれらの研究結果を基に唾液を検体として、自立高齢者および要介護高齢者の好気性菌並びに嫌気性菌について同時に検出を試みた。

本研究において、自立高齢者および要介護高齢者の口腔から複数種の好気および嫌気性の起炎性微生物が検出された。自立高齢者および要介護高齢者では、好気性微生物に比べ *Prevotella melaninogenica* や *Capnocytophaga sp.* のような嫌気性微生物の検出率が高かったことから、対象者においては、嫌気性微生物による口腔感染・発症のリスクが高まっているものと考えられた。嫌気性微生物は、肺炎や心臓疾患などの全身性疾患

の発症に関与していることから、一般に易感染性である高齢者においては、これらの嫌気性微生物の検出状況を指標とした確実な口腔ケアの実施が重要となることが示された。さらに、要介護高齢者では自立高齢者に比べ、*Candida sp.*、*Corynebacterium sp.*、*Klebsiella pneumoniae* や MSSA の検出率が高かったことから、肺炎の発症リスクが高い状況にあると考えられる。

口腔清掃習慣については、自立高齢者では半数以上が1日1回以上の歯磨き習慣を有しており、要介護高齢者では全員が毎食後に介助者によってガーゼによる口腔内清拭を受けていた。歯磨き回数と細菌の検出状況との関連について詳細な検討を行っていないが、確実な口腔細菌のコントロールには単に歯磨きの回数だけでなく、その方法・手技といった質的なものが重要であると考えられた。さらにガーゼを用いた介助者の口腔清拭は細菌感染予防には効果が少ないことが明らかになった。したがって、歯磨きの実施が困難な高齢者、特に要介護高齢者では殺菌性を有する薬剤を併用するなどの試みが必要と考えられた。

要介護高齢者の多くは1種類以上の薬剤を常用していたが、自立高齢者でも同様の状況が推察される。今後、常用している薬剤と口腔細菌叢との関連についても検討していく予定である。

## E. 参考文献

1. 厚生省の指標（臨時増刊），国民衛生の動向，54（9）：36，2007.
2. 佐々木英忠，中山勝敏，鎌仲正人：誤嚥性肺炎のメカニズムと最近の知見，歯界展望 91：1280-1287，1998.
3. 米山武義：口腔ケアの今日的とらえ方と誤嚥性肺炎予防，歯界展望 91：

- 1276-1479, 1998.
4. Ely EW, Haponik EF: Pneumonia in the elderly. *J Thorac Imaging* 6: 46-61, 1991.
  5. Niederman MS : Nosocomial pneumonia in the elderly patient. Chronic care facility and hospital considerations. *Clin Chest Med* 14: 479-490, 1993.
  6. Marrie TJ, Durant H, Yates L: Community-acquired pneumonia requiring hospitalization: 5-year prospective study. *Rev Infect Dis* 11: 586-599, 1989.
  7. 斎藤 厚, 河野 茂 : 呼吸器感染症における口腔内常在細菌の意義 — とくに嫌気性菌について —, *Prog Med* 9:15-19, 1989.
  8. 三宅洋一郎 : 口腔粘膜, *Today's Therapy* 2: 5-8, 1995.
  9. 奥田克爾 : 老人性肺炎と口腔細菌, *日歯医師会誌* 49: 4-12, 1996.
  10. 弘田克彦, 奥田克爾, 太田昌子 : プロフェッショナル・オーラル・ヘルス・ケアを受けた高齢者の咽頭細菌数の変動, *日老医誌* 34: 125-129, 1996.
  11. 米山武義 : 誤嚥性肺炎予防における口腔ケアの効果, *日老医誌* 38: 476-477, 2001.
  12. Margaret ST, George WT, Dennis EL, Connie KK, Liza BD, Walter JL : Aspiration pneumonia: Dental and oral risk factors in an older veteran population. *A. Am Geriatr. Soc.* 49: 557-563, 2001.
  13. 泉福英信, 十亀 輝, 由川英二, 花田信弘 : 特別養護老人ホーム等施設内高齢者の口腔バイオフィルム内細菌群と全身疾患との関連, *Bacterial Adherence 研究* 14: 21-26, 2000.
  14. 奥田克爾 : 新口腔感染症とアレルギー, 一世出版, 東京, 311, 2000.
  15. Granton JT, Grossman RF: Community-acquired pneumonia in the elderly patient. Clinical features, epidemiology and treatment. *Clin. Chest Med.* 14: 537-553, 1993.
  16. 高田将成, 佐藤 勉, 泉福英信, 花田信弘 : 自立生活高齢者と要介護高齢者の口腔微生物叢の比較, *口腔衛生会誌* 54 : 178-188, 2004.
  17. Nakamura S, Tanaka T, Nomura Y, Sato T: Oral opportunistic pathogens and oral health care in assistance-dependent elderly. *Int J Oral Health* 3: 45-51, 2006.
  18. Sato T, Tanaka T, Yaegaki K: Comparison of the oral flora of independent elderly and those requiring nursing assistance. *Dentistry in Japan* 42: 86-89, 2006.
  19. 清水孝悦, 田中とも子, 佐藤 勉 : 自立高齢者における口腔日和見菌に関する口腔保健学的研究, *Bacterial Adherence & Biofilm* 20: 63-69, 2006.
- F. 健康危険情報**
- 特に記載事項なし。
- G. 研究発表**
- 特に記載事項なし。
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- 特に記載事項なし。

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

唾液検査による歯周病スクリーニング精度の向上

分担研究者 野村義明

国立保健医療科学院口腔保健部・口腔保健技術室長

唾液中の炎症を表すバイオマーカーである乳酸脱水素酵素（LDH）、ヘモグロビン（HB）は歯周病の進行状態と関連があるものの、関連性が弱く、スクリーニングとしての感度、特異度が低いことが問題であった。本研究課題では歯科診療所通院中の患者 104 名を対象に唾液中の LDH、HB を測定し背景因子である年齢、現在歯数を共変量として調整した後の値を用いて LDH、HB による歯周病スクリーニングの有用性を検討した。その結果、従来の結果で得られていた感度、特異度より高い値が得られその有用性が明らかとなった。またこれらのマーカーは採取が容易なこと測定費用が安価なことから寝たきり高齢者にも適用が可能であり、口腔内の炎症状態を歯科関係者以外でも数値によってモニタリングしてゆくことが可能である。しかし、公衆衛生でこれらの手法を用いるのは煩雑であるため、より大きな母集団で年齢、現在歯数また性別、喫煙歴ごとの基準値を設定してゆく必要がある。

A. 研究目的

歯周病は、歯肉に存在する歯周病菌の毒素によって病態が形成される。その結果として結合組織分離、及び、骨吸収に至る宿主の炎症性の反応を誘発する。临床上、歯周病は、歯周ポケットの深さ、アタッチメントレベル、出血、骨吸収（*Taba et al, 2005; Kinney et al, 2007*）の精査によって診断される。地域保健において歯周病は、重要な主題である。歯周病は自覚症状のないまま進行する疾患であるため、歯周病の初期段階で歯周病を

発見することが重要な課題である。

従来、集団健診においては歯周病は臨床における診断方法と同様な手法を歯科医療関係者によって代表歯に用いることによって行われてきた。この方法論は歯周病健診の受診率を低下させ、歯科医療関係者の人件費から歯周病健診の費用を高沸させてきた。またこの方法論は時間がかかり、その結果として一日に健診できる人数に限りがあった。

上記の問題を克服するため、医科で一般的に行われている血液、尿または唾液を用いて歯周病をスクリーニングする試

みを行ってきた。その結果として唾液中の乳酸脱水素酵素（LDH）とヘモグロビン（HB）が歯周病スクリーニングの候補となるバイオマーカである可能性が示唆された。これらの酵素は口腔内の炎症、出血を示すマーカであり、高齢者の誤性肺炎のスクリーニングとしても使用できる可能性がある。しかし、これらのバイオマーカによるスクリーニングではその感度、特異度などが決して高い値ではないことが問題として残っていた。しかしこれらのバイオマーカの有用性を検討した研究は年齢層、性別、歯周病の罹患状態などの点で均一な集団ではなかった。この点を考慮し本研究課題ではこれらの問題点を解決するため共分散分析を適用して歯周病の病態進行に関連する交絡因子を調整することによってスクリーニングの精度が向上するかを検討した。

## B. 研究方法

### 1. 調査対象

調査対象者は愛媛県歯科医師会の協力により愛媛県歯科医師会会員の18の診療所に通院する患者を対象とした。調査対象者数は104名であり、その内訳は男性63名、女性41名、年齢19-77歳、平均年齢は42.96 +/- 19.33であった。本研究に際しては鶴見大学歯学部倫理委員会の承認を得ている。

### 2. 口腔内診査

本研究実施前の歯周ポケット測定のカリブレーションの講習会を実施した。各歯科医院ではトレーニングを受けた歯

科医師が歯周ポケットの測定を行った。歯周ポケットの測定はWHOプローブを用いCPIの基準に従って行った。また現在歯数を記録した。

### 3. 唾液中バイオマーカの測定

唾液は口腔診査前に採取した。採取方法は5分間無糖ガムを咀嚼させ刺激唾液を採取した。採取した唾液は4℃で保管し分析を行った。唾液中の乳酸脱水素酵素（LDH）はL type LDH Wakoを用いて測定した。ヘモグロビンは保存液に希釈後ラッセクスビーズ法にて測定した。

### 4. 統計解析方法

CPIと各因子の関連は連続変数に対してはKruskal-Wallisを、カテゴリカル変数に対してはFisherの正確確率計算法を用いた。共分散分析（ANOVA）はLDH、HBを目的変数としCPIを固定因子とした。またCPIとの関連において統計学的に有意であった変数は共変量とした。CPI: 1, 2, 3, 4の各スクリーニングとしての基準値の設定はROC曲線を用い感度と特異度の差が最も小さくなる点を基準値とした。またarea under ROC curve（AUR）も算出した。変数にはLDH, HBの測定値の他、共分散分析で得られた共変量調整後の変数もあわせて用いた。

## C. 研究結果

CPIとの関連では性別、年齢、現在歯数、喫煙歴が統計学的に有意であった。年齢の増加とともに歯周病の病態が重篤になってゆく関係が見いだされたが、

CPI2 の患者に対しては、CPI3 の患者より平均年齢が高いという結果であった。CPI の 0 から 3 までの間は現在歯数の減少はわずかな値であった。しかし CPI3 と 4 の間で現在歯数が大きく減少する結果が得られた。男性と女性の比較では男性の方が歯周病が重篤である結果であった。喫煙歴も CPI と統計学的に有意な関連が見いだされたが、喫煙者と過去の喫煙者の差も小さなものであった。

唾液中の LDH と HB はともに CPI と有意な関連性を示さなかった。CPI と関連のあった因子を共分散分析で共変量として調整を行った。年齢、現在歯数、性別、喫煙歴を共変量として共分散分析を行った。その結果、感度、特異度の算出においては LDH、HB の測定値そのものと大きな変化はみられなかった。共分散分析では一般的にカテゴリカル変数を共変量として用いるのは適切ではないとされている。そこで連続変数である年齢と現在歯数のみを共変量として共分散分析を行った。調整後の LDH、HB の値とも CPI と統計学的に有意な関連を有した。この調整後の変数を用いて ROC 曲線を描き、AUR を算出した。CPI4 のスクリーニングにおいては LDH、HB とともに AUR の値は 0.7 を超えた。

#### D. 考察

本研究では CPI と関連を有する Demographic 因子の調整を共分散分析を用いて行った。年齢、現在歯数、喫煙歴が歯周病の進行状態と関連を有することは多くの研究から明らかになっているが、

本研究の結果もそれと一致した。従来、CPI などの歯周病の指標を LDH、HB は弱い関連しか得られなかった。本研究課題ではその点を見直すための基礎として統計モデルの手法を用いて調整後の統計学的有意性を検討した。その結果、CPI と LDH、HB において有意な関連が認められた。

本研究では CPI1 と 3 で LDH、HB の値が大きく異なった。CPI1 では出血、CPI3 では 4-5 mm の歯周ポケット形成という歯周病の進行にあわせて炎症のレベルも上がりその結果として唾液中の LDH、HB の値が高くなったものと考えられる。しかし、CPI2 においてはその判定基準が歯石形成という歯周病の進行状態を必ずしも表していない判定基準であるため用量反応性が得られなかったものと思われる。

歯周病の診断、スクリーニングには多くのバイオマーカーが研究されている。しかし、これらのマーカーはサンプリング方法が複雑であったり、測定にかかる費用が高価であったり、研究用の試薬で測定し、診断に使用することが禁止されているものも多い。この点で唾液中の LDH、HB は測定価格も安価であり、サンプルの採取方法も容易であるため、その有用性は高い。また、寝たきり高齢者等にも適用可能である。今後、今回のデータの基準値を参考に対象者を寝たきり高齢者にシフトさせ誤嚥性肺炎との関連性を検討してゆく予定である。

#### E. 結論

本研究課題では歯科診療所通院中の患

者 104 名を対象に唾液中の LDH, HB を測定し背景因子である年齢, 現在歯数を共変量として調整した後の値を用いて LDH, HB による歯周病スクリーニングの有用性を検討した。その結果, 従来の結果で得られていた感度, 特異度より高い値が得られその有用性が明らかとなった。

特に記載事項なし。

### G. 研究発表

特に記載事項なし。

### H. 知的財産権の出願・登録状況

### F. 健康危険情報

特に記載事項なし。

表 1. 背景因子とCPIの関連

(A) 連続変数

CPI	0	1	2	3	4	Total	P-value
n	28	21	18	25	9	101	
Age	35.54+/-9.17	42.04+/-9.14	45.28+/-6.35	44.68+/-7.48	55.04+/-9.22	42.62+/-9.84	<0.001
Number of remaining teeth	27.25+/-1.38	26.52+/-2.44	27.17+/-1.58	27.24+/-1.45	22.56+/-3.71	26.66+/-2.34	0.001
Saliva volume	7.88+/-2.59	8.68+/-2.31	8.29+/-2.39	8.58+/-2.83	7.63+/-2.33	8.27+/-2.53	0.727

P-value は Kruskal -Wallis testにより算出。

(B) カテゴリカル変数

		CPI					Total	P-value
		0	1	2	3	4		
Gender	Female	23	14	10	13	3	63	0.047
	Male	5	7	8	12	6	38	
Smoking	Nonsmoker	25	15	12	19	3	74	<0.001
	Previous Smoker	3	0	4	4	0	11	
	Current Smoker	0	6	2	2	6	16	
Prescription drug	No	24	19	16	21	7	87	0.900
	Yes	4	2	2	4	2	14	
Total		28	21	18	25	9	101	

P-values はFisher' s exact testsにより算出。

表 2. 唾液中 LDH、HB, の計測値と年齢、現在歯数調整後の値とCPIの関連

CPI	0	1	2	3	4	Total	P-value
Crude LDH	171.21+/-20.56	245.5+/-37.77	192.89+/-57.21	271.04+/-148.39	290.67+/-188.21	225.68+/-105.69	0.167
Adjusted LDH	171.21+/-20.47	245.5+/-32.71	192.89+/-49.13	271.04+/-122.25	290.67+/-184.22	225.68+/-95.48	<0.001
Crude Hb	1.422+/-2.422	3.543+/-9.780	2.465+/-5.503	6.263+/-20.169	3.386+/-8.143	3.422+/-11.646	0.705
Adjusted Hb	1.422+/-1.146	3.72+/-2.197	2.464+/-1.661	6.263+/-7.341	3.386+/-1.582	3.456+/-4.287	<0.001

P-values は Kruskal-Wallis testsにより算出。調整は共分散分析によって行った。調整後のLDH, HBはともにCPIと有意な関連性を有した。LDHに関してはCPI2の値により用量反応性が得られていない。HBに関してはCPI3と4の間でCPI3の方が高い値を示しているがこれはCPI3に一名、99.05 mg/dlという高い値を示した者がいたためである。

表3. LDH, HBの歯周病に対するスクリーニングの基準値

Crude LDH						Adjusted LDH						
Out of point	AUR	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value	Out of point	AUR	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value	
CPI1	177.5	0.624	0.575	0.571	0.778	0.571	204.1	0.963	0.903	0.893	0.956	0.893
CPI2	182.5	0.511	0.519	0.531	0.540	0.531	201.6	0.713	0.731	0.729	0.745	0.729
CPI3	182.5	0.533	0.529	0.522	0.360	0.522	208.6	0.807	0.794	0.803	0.675	0.803
CPI4	217.5	0.617	0.556	0.652	0.135	0.652	229.7	0.713	0.667	0.670	0.167	0.670

Crude HB						Adjusted HB						
Out of point	AUR	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value	Out of point	AUR	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value	
CPI1	0.249	0.546	0.554	0.536	0.750	0.536	2.244	0.872	0.833	0.750	0.896	0.750
CPI2	0.295	0.529	0.519	0.551	0.551	0.551	2.877	0.737	0.731	0.583	0.655	0.583
CPI3	0.325	0.571	0.559	0.582	0.404	0.582	3.185	0.755	0.706	0.773	0.615	0.773
CPI4	0.387	0.607	0.556	0.739	0.172	0.739	3.526	0.640	0.636	0.593	0.069	0.407

AUR (Area Under the ROC curve) はROC曲線の下面積を表しスクリーニングの精度が高いほど高い値を示す。年齢、現在歯数調整後の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、AURの値は全て上昇した。LDHに関しては、基準値はCPI2の値が低く用量反応性はこの部分のみ成立していない。





厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

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？

研究協力者 寺田邦彦，室繁郎，伊藤穰，三嶋理晃

京都大学医学部附属病院呼吸器内科

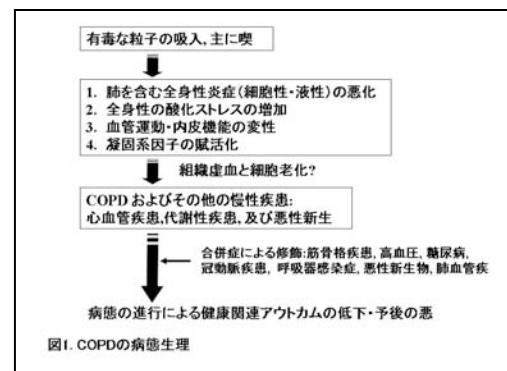
慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive lung disease, COPD）は、有毒な粒子の吸入（喫煙など）により、気管支・肺胞に慢性炎症をきたし、咳、痰、労作時の呼吸困難などの症状とともに、不可逆的な気道閉塞（息を吐き出しにくくなる障害）を来す慢性呼吸器疾患である。COPD は 70 歳代をピークとして中高年の喫煙者に多い病気で、本邦では 40 歳以上の約 530 万人が罹患していると推定されている。世界的にも増加傾向にあり、世界の疾患別死因順位で 1990 年第 12 位から 2020 年には第 5 位になると考えられている。COPD は、主に気道感染、大気汚染物質などにより急激に呼吸器症状が悪化（増悪）することで、病態が進行する。COPD 増悪は死亡率増加・医療費高騰の原因であり、増悪の予防・抑制は極めて重要である。COPD 発症、増悪の予防・抑制のため禁煙は極めて重要であるが、禁煙後も慢性炎症が遷延し病態が進展することから、喫煙以外にも様々な危険因子が検討されている。本研究は、その危険因子として口腔内細菌を想定し、COPD 患者の病態と代表的な歯周病細菌に対する血清 IgG 抗体価（歯周病菌感染度の指標）の関連性を統計学的手法によって検討した。対象患者は、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）とし、血清 IgG 抗体価の測定は通法にしたがい ELISA 法を用いて行った。本研究結果は、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ものであった。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。

A. 研究目的

慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive lung disease, COPD）は、有毒な粒子の吸入（喫煙など）による慢性炎症により実質性病変（肺気腫）、気道病変（慢性気管支炎）を生じ、不可逆的な気道閉塞（息を吐き出しにくくなる障害）を来す慢性呼吸器疾患である。本邦では、500 万人以上が罹患し、その率は高齢化するにしたがい上昇することが知られ、とりわけ 70 歳以上では約 17% が罹患すると言われている。したがって、COPD は老年病の一つとして理解されてい

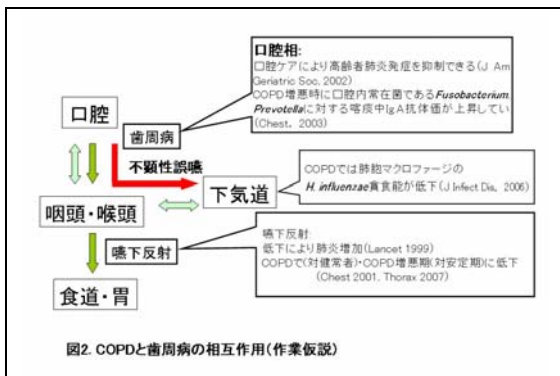
る。（COPD の病態生理を図 1 に示す。）。

歯周病は歯周組織の炎症に始まり、次



第に歯を支える歯槽骨が吸収され、歯の脱落を引き起こす慢性感染症である。歯周病の大部分を占める慢性歯周炎の原因菌は、*Porphyromonas gingivalis*などの偏性嫌気性グラム陰性細菌であることが知られているが、昨今、歯周病研究は大きなパラダイムシフトを起こしている。すなわち、様々な疫学研究によって歯周病と全身疾患との関連が指摘、報告されるようになった。

最近、Leuckfeldらは、疫学研究によって、COPD症例では非COPD呼吸器疾患症例と比較して有意に歯周病による歯槽骨吸収の程度が増加することを示した (Leuckfeld *et al*, *Respir Med*, 102, 488-494, 2008)。このことは、COPDと歯周病の関連性を予感させるものであるが、その詳細なメカニズムについては不明な点も多い。そこで本研究では、図2に示す作業仮説を設定し、歯周病菌感染度検査として歯周病細菌に対する血清IgG抗体価検査を利用して、COPD患者の病態と歯周病菌感染度の関連性を検討することを目的とした。



## B. 研究方法

### 1. 対象

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)とした。除外基準として、①喫煙指数 < 20 packs-years, ②COPD以外の呼吸器疾患合併, ③5年以内の悪性疾患罹患, ④全身性ステロイドの定期服用の4項目を設定した(表1参照)。

	n = 63	
Age (yr)	73.0	(71.7-75.4)
Sex (M:F)	61:2	
Smoking status (C:F)	5:58	
Pack-years	65.5	(57.0-74.1)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.0	(21.1-22.4)
FEV <sub>1</sub> (% pred)	53.3	(50.2-58.9)
RV/TLC (%)	44.1	(42.7-45.8)
D <sub>1CO</sub> /V <sub>A</sub>	2.6	(2.4-2.9)
PaO <sub>2</sub> (Torr)	72.4	(70.9-76.6)
PaCO <sub>2</sub> (Torr)	39.7	(38.5-40.5)
Exacerbation frequency (/year)	1.9	(1.4-2.5)

Mean and interquartile range (95% confidence interval (CI))

## 2. 評価項目

COPD増悪の同定: Anthonisenの定義を修正した基準を用いた。

歯周病病原菌に対する血清IgG抗体価: 血清IgG抗体価は、Murayamaらの記載 (*Adv Dent Res*, 1988) に従い、患者の末梢血から分離した血清を用いてELISA法によって測定した。また、健常者の平均値よりも2SDを超えて高い血清抗体価を“陽性”と設定した。また、抗原として用いた歯周病細菌は、*Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) Y4, Aa SUNY67, Aa ATCC29523, *Capnocytophaga ochracea* (Co) S3, *Eichenerra corrodens* (Ec) FDC1073, *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Prevotella intermedia* (Pi) ATCC25611, Pi ATCC33563, *Porphyromonas gingivalis* (Pg) FDC381, Pg SU63, *Treponema denticola* (Td) ATCC35405, *Campylobacter rectus* (Cr) ATCC33238の8菌種(12菌株)とした。

炎症性メディエーターの測定: 血清中の高感度CRP, および喀痰中の総細胞数・分画, 上清中IL-8およびTNF-alphaの濃度を測定した。

嚥下反射の評価: Simple two-step swallowing provocation test (STS-SPT)

を用いて行った (Teramoto *et al*, Lancet, 1999)。

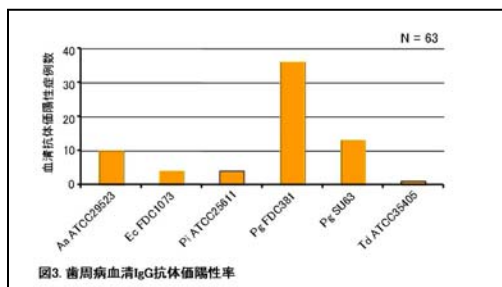
### 3. 倫理面への配慮

本研究は、京都大学の研究倫理委員会の承認を得て実施された。血清 IgG 抗体価の外注は、各々の血清試料をランダムに符号化された後に外注しており、患者情報等が外部に流出される危険性がない状況をアレンジした。

## C. 研究結果

### 1. 血清菌周病抗体価陽性率

Pg FDC381 57% > Pg SU63 21% > Aa ATCC29523 16%の順に高率であった (図 3)。



### 2. 陽性率に影響する因子

Pg FDC381 に対する血清 IgG 抗体価の陽性判定は、「年齢」が陽性：陰性 = 72.0±1.2 歳：75.5±1.3 歳 (P=0.03) となり、血清 IgG 抗体価陽性者の年齢が有意に低いことがわかった (表 2)。

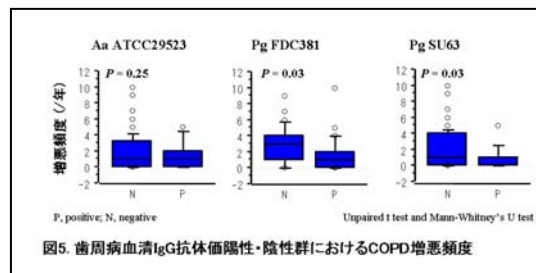
	Aa ATCC29523	Pg FDC381	Pg Su63
Age (yr)	0.51	0.03	0.62
Sex (M:F)	0.29	0.50	1.00
Smoking status (C:F)	0.18	0.64	1.00
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.60	0.78	0.72
FEV <sub>1</sub> (% pred)	0.86	0.50	0.46
RV/TLC (%)	0.46	0.70	0.80
D <sub>CO</sub> /V <sub>A</sub>	0.06	0.34	0.41
PaO <sub>2</sub> (Torr)	0.30	0.45	0.67
PaCO <sub>2</sub> (Torr)	0.15	0.06	0.18
Inhaled corticosteroid (P/N)	0.16	0.07	0.35

Unpaired t test and Chi squared test

### 3. 血清 IgG 抗体価と COPD 増悪との関連性

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) (図 5)。また、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) (表 3)。

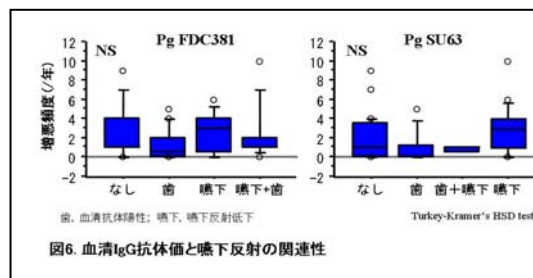


血清抗体価	頻回増悪 (3回/年以上)の有無			
	無	有	無	有
陰性	35	18	13	14
陽性	8	2	30	6
	Aa ATCC29523		Pg FDC381	
	P = 0.48		P = 0.006	
			Pg Su63	
			P = 0.047	

Chi-squared test, Fisher's exact probability test

### 4. 血清 IgG 抗体価と嚥下反射の関連性

嚥下反射の増悪頻度は、すべての血清 IgG 抗体価と統計学的に有意な相関を認めなかった。また、血清抗体価と嚥下反射の増悪についても相加・相乗効果を認めなかった (図 6)。



### 5. 血清 IgG 抗体価と炎症反応

抗体価陽性・陰性群で血漿 CRP, および喀痰上清中の IL-8・TNF-alpha 濃度に有意な差は認めなかった (図 7)。

## D. 考察

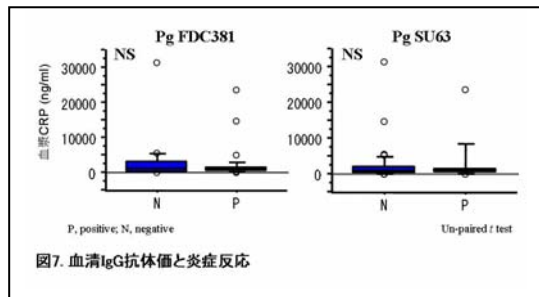


図7. 血清IgG抗体価と炎症反応

本研究は、歯周病細菌に対する血清 IgG 抗体価と COPD 増悪との関連性を調べたものである。我々の作業仮説においては、血清 IgG 抗体価の上昇、すなわち歯周病細菌感染度の上昇により COPD 増悪頻度が増加すると考えていた。しかしながら、今回、Pg FDC381 あるいは Pg SU63 に対する血清 IgG 抗体価上昇は COPD 頻回増悪の減少と統計学的に有意に関連しているという結果を得た。このことは、Pg FDC381 に対する血清 IgG 抗体価は、陰性例に比して陽性例で有意に年齢が低いとする結果で説明できるかもしれない。すなわち、COPD では加齢が増悪の危険因子の一つであり、その一因として免疫機能の弱体化が想定されていることから、この免疫機能の弱体化が本研究で得られた歯周病細菌に対する抗体産生性の低下という現象に反映している可能性がある。しかしながら、Pg FDC381 に対する血清 IgG 抗体価と年齢との関連性については、年齢に伴う残存歯数の減少による歯周病菌感染度の低下を反映しているだけかもしれない。すなわち、歯周病抗体価低下が、(1) 免疫機能の弱体化を反映しているのか、(2) 単に残歯数の減少による低下を反映しており、COPD 増悪頻度の上昇とは関連性がないかいずれの可能性も考えられる。

以上のことから、今後、一連の病態における詳細なメカニズムについては、さらなる検討が必要である。すなわち、血清 IgG 抗体価と COPD 増悪との関連性をさらに深く検討するため、今回の研究で検討してい

なかった COPD 患者の歯周病組織検査を行う必要があると考えている。具体的には、COPD 例で歯周病抗体価が歯周病を反映するかどうかを検討するため、少なくとも、患者の口腔のパノラマ X 線撮影等による画像診断を行い、COPD 患者の歯周病の状態を Validation することで、本研究の問題点は解決できる。さらに、免疫学的に COPD 患者の Th1/Th2 バランスの異常の可能性も考え、例えば、加齢に伴う T 細胞（特に CD4 + T 細胞, Th1）の活性化減少による Th2 側への免疫シフトが COPD 増悪の病態形成に関与するという反応も一考に値する。したがって、COPD 患者の末梢血好酸球, IgE, サイトカイン (IL-2, IFN- $\gamma$ /IL-4, IL-5) の評価も今後の検討課題であろうと考える。

## E. 結論

本研究から、疫学的な手法によって歯周病細菌に対する血清 IgG 抗体価と COPD 増悪との関連性を示唆する結果を得た。今後、さらに高齢者における口腔内感染度と COPD の関連について、分子レベルで検討する予定である。

## F. 健康危険情報

特に記載事項なし。

## G. 研究発表

特に記載事項なし。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特に記載事項なし。

## —参考—

## COPD (Chronic Obstructive Pulmonary

## Disease, 慢性閉塞性肺疾患) とは

閉塞性肺疾患の代表として、COPD（肺気腫，慢性気管支炎）および気管支喘息がある。気管支喘息は気道過敏性による喘鳴，息切れ，胸部圧迫感，咳嗽が夜間から早朝に悪化する症状を伴う慢性炎症性疾患で可逆性を有する気流閉塞に特徴づけられるのに対して，COPDは有毒な粒子の吸入（喫煙など）による慢性炎症により末梢気道病変（慢性気管支炎）と肺実質病変（肺気腫）を生じ，不可逆的な気流閉塞を有する疾患であり，労作時呼吸困難，運動耐容能の低下などの症状により特徴づけられる。様々な肺外病変を合併することが多く，肺病変＋肺外病変が相まって病態が進行することが，近年明らかとなってきた。

### 1. 症状・身体所見

当初は症状を呈さないことも多い。一般的には病態の進行とともに慢性咳嗽，喀痰，労作時呼吸困難が生じる。身体所見では，当初は全く所見を認めないことが多いが，病態の進行に伴い肺の過膨張による「ビア樽状胸郭」，努力呼吸に伴う呼吸補助筋（胸鎖乳突筋，斜角筋など）の肥大や鎖骨上窩や肋間腔の陥凹，またチアノーゼなどの呼吸不全症候（低酸素血症）や，浮腫などの症状が出現する。

### 2. 診断

COPDは，肺機能検査（スパイロメトリー）にて不可逆性を有する気流閉塞を認めることにより診断される（気管支拡張剤吸入後（サルブタモール 400 $\mu$ g）の1秒量（FEV<sub>1</sub>）/努力性肺活量（FVC）<0.70）。FEV<sub>1</sub>予測値の80%以上 = stage I, 80%未満, 50%以上 = stage II, 50%未満, 30%以上 = stage III, 30%未満 = stage IVの4段階に重症度分類される。

### 3. 病因

発症要因としては外的因子として，喫煙，職業上の粉塵の吸入，化学物質への曝露および下気道感染などが，内的因子としては $\alpha$ 1アンチトリプシン欠損症，宿主側遺伝子多型性，気道過敏性などが推定されている。長期間の喫煙など有害物質の吸入により，慢性的な炎症が惹起され，この炎症により肺内でプロテアーゼ/アンチプロテアーゼ不均衡，オキシダント/アンチオキシダント不均衡を生じ，主に末梢気道の線維化と肺胞破壊により，気流閉塞を来す。同時に，慢性炎症により，ガス交換能障害，粘液過分泌，肺高血圧や，類そう，骨格筋疲労，骨粗鬆症，うつ，貧血，心血管病変の合併により病態が形成される。



**Potential Benefits of Serum IgG Antibody Titer against Periodontal Bacteria in the Prognosis for Periodontitis Recurrence**

Noriko Sugi<sup>1,2</sup>, Koji Naruishi<sup>1</sup>, Fumio Myokai<sup>1</sup>, Hideo Arai<sup>1</sup>, Kyoko Katsuragi-Fuke<sup>1</sup>, Takayuki Kono<sup>3</sup>, Fusanori Nishimura<sup>1</sup>, Shogo Takashiba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathophysiology-Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan

<sup>2</sup>Rijinkai Medical Foundation Kohsei General Hospital, Mihara, Japan

<sup>3</sup>Department of Comprehensive Dental Clinic, Okayama University Hospital of Medicine and Dentistry, Okayama, Japan

Corresponding author: Dr. Shogo Takashiba, D.D.S., Ph.D.

Professor and Chair

Department of Pathophysiology - Periodontal Science,  
Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry  
and Pharmaceutical Sciences

2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700-8525, Japan

Telephone: (81) (86) 235 6675; Fax: (81) (86) 235 6679

e-mail address: stakashi@cc.okayama-u.ac.jp

Present address: Fumio Myokai, D.D.S., Ph.D.:

Life Science Laboratory, Asano Industry Co. Ltd, 3-20-6, Tamahara,  
Tamano, Okayama 706-0014, Japan

Present address: Fusanori Nishimura, D.D.S., Ph.D.:

Department of Dental Science for Health Promotion, Division of  
Cervico-Gnathostomatology, Hiroshima University Graduate School of  
Biomedical Sciences, 1-2-3 Kasumi, Kasumi-ku, Hiroshima, 734-8553,  
Japan

**Running title: Prognosis of periodontitis recurrence by serum IgG level**

**Key words:** serum IgG antibody titer; periodontitis recurrence; supportive periodontal therapy; ELISA

**Chronic periodontitis is a poly-microbial infectious disease and the patients exhibit high serum IgG titers against periodontal bacteria. We divided the 139 chronic periodontitis patients into 2 groups, normal and high serum IgG titer group after periodontal treatment, and investigated the significant differences between both groups in the recurrence ratio of periodontitis. Interestingly, the recurrence ratio in high IgG titer group against each periodontal bacteria, especially gram-negative obligate anaerobe such as *Prevotella intermedia* and *Treponema denticolla* was higher than that of the normal IgG titer group. Therefore, we conclude serum IgG antibody titer is useful in the prognosis for periodontitis recurrence.**

Chronic periodontitis is the most common polymicrobial infectious disease and the disease may result in loss of teeth by inflammation-mediated bone resorption [1]. Infection with periodontal bacteria, especially gram-negative, obligate anaerobe such as *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) leads to humoral immunological responses and elevates the levels of serum IgG antibody titer against the bacteria [2]. There are various reports regarding the usefulness of examination of serum IgG antibody titer during treatment of periodontitis [3-5]. However, it has not been established whether of the level of serum IgG antibody titer can be used to predict periodontitis recurrence after the completion of periodontal treatment.

In the present study, we examined the level of infection of several periodontal bacteria by serum samples from patients

using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods and evaluated the relation of serum IgG antibody titer to recurrence of periodontitis during periodontal maintenance phase.

The subjects included 139 chronic periodontitis patients who visited the Department of Periodontics and Endodontics, Okayama University Hospital of Medicine and Dentistry and received dynamic periodontal treatments, followed by supportive periodontal therapy (SPT) for more than 1 year (male: 34, female: 105, average age: 61.4  $\pm$  10.4). The dynamic periodontal treatments include scaling, root planning, under infiltration anesthesia and periodontal surgeries at 1 or more sites. SPT procedures included re-motivation, plaque control guidance, scaling and root planning and removal of local



environmental factors at intervals of a few months. Patients with systemic diseases such as diabetes were excluded from this study because of their known risk factors for periodontal diseases. Additionally, patients were screened for risk behaviors such as smoking, by directed interviews and excluded, as well as any relevant systemic conditions or medication intake. Informed consent was obtained from each subject, and the protocol for the evaluation of serum IgG titer has been approved by the institutional review board. Based on the previous report [6], patients with one or more deepening periodontal pockets with a depth of 3 mm or more in SPT phase were judged to be “with recurrence”.

The amount of serum IgG that bound to each pathogenic bacteria antigen causing periodontitis was measured by ELISA as described previously [2]. Since the bacterial antigens include various components, mainly proteins, lipopolysaccharide (LPS) and DNA, the serum IgG antibody titer reflects total results of immune-responses. Therefore, we used sonic extracts of whole bacterial cells as antigens for ELISA assay. In brief, total 1 g (wet weight) of each bacteria, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) Y4, Aa

ATCC29523, *Eikenerra corrodens* (Ec) FDC1073, *Prevotella intermedia* (Pi) ATCC25611, *Pg* FDC381, *Pg* SU63, *Treponema denticola* (Td) ATCC35405, and *Campylobacter rectus* (Cr) ATCC33238 was suspended in 40 ml of 5 mM phosphate buffer (pH 7.4) and disintegrated with 1 g of glass beads (diameter, 0.18 mm; Takashima Shoten, Tokyo, Japan) in an ultrasonic disruptor (Model UR-200P; Tomy Seiko, Tokyo Japan) set at 200 W for 15 min at 4 °C. The sonicated cell suspension was centrifuged at 10,000 × g for 20 min to remove unbroken cells and cell debris and the supernatant was used as sonic extract.

During the SPT phase, patients were first classified into a “Recurrence group” (with recurrence or progression of periodontitis) and a “Stable group” (without recurrence or progression of periodontal disease) for a case-control study. A total of 139 patients (Stable group: 112, Recurrence group: 27) were evaluated. There were no significant differences between the stable and recurrence group in the score of their plaque control record, bleeding on probing and even averaged pocket probing depth. On the other hand, there were significant differences between

stable and recurrence groups in their age and number of teeth (age,  $P=0.026$ ; number of teeth,  $P=0.025$ ; Mann-Whitney U-test). As shown in Figure 1, in 12 strains from 8 bacterial species, the average of serum IgG antibody titer against all periodontal bacteria after periodontal treatment in recurrence group was higher than that of stable group. Importantly, the levels of serum IgG antibody titer against several periodontal bacteria were statistically higher in the recurrence group than that of stable group before transition to SPT phase (*Aa* Y4,  $P=0.020$ ; *Ec* ATCC23834,  $P=0.040$ ; *Pg* SUNY67,  $P=0.020$ ; *Cr* ATCC33238,  $P=0.025$ ; Mann-Whitney U-test). The serum IgG antibody titer against *Td* ATCC35405 was also clearly higher in the recurrence group than in the stable group ( $P=0.081$ ; Mann-Whitney U-test) after periodontal treatment.

Next, the patients were classified into “High IgG titer” and “Normal IgG titer” group at the time starting SPT phase for a companion study. We determined the baseline “Normal” IgG titer level by measuring the serum IgG antibody titer in healthy volunteers without chronic periodontitis ( $n=8$ ,  $30.3 \pm 4.9$  yr). Patients in this study having IgG titer levels significantly above the average ( $>$

$2\sigma$ ) of healthy volunteers were classified as high level-serum IgG antibody titer against periodontal bacteria. The IgG antibody titer obtained from the test was indexed using the width of 2 SD determined from the group of 10 healthy subjects (aged: 20-29 yr). The following formula was applied to the EU value to calculate the diagnostic standardized value:

$$\text{Test Result (Standardized Value)} = \{\text{IgG Titer of patient (EU}_i\text{)} - \text{mean IgG titer of healthy control subjects (EU}_{\bar{x}}\text{)}\} / 2\text{SD}$$

In the “Normal” group, the level of serum IgG antibody titer was observed to be lower than 1.0 against each type of bacteria. In the “High” group, the level of serum IgG antibody titer exceeds 1.0 against periodontal bacteria.

As shown in Table 1, importantly, we found that there were no significant differences between Normal and High IgG antibody titer group in clinical findings (Mann-Whitney U-test) and confirmed to become healthy clinically in both groups by periodontal treatment. Furthermore, we observed the tendency that the recurrence ratio of high IgG titer group was higher than that of normal group (Normal group: 14.9-19.1 %, High group: 20.5-36.8 %). Especially, the

recurrence ratio of high IgG titer group was statistically higher than that of normal titer group (*Pi* ATCC25611, P=0.021; *Td* ATCC35405, P=0.039; *Cr* ATCC33238, P=0.048: Pearson's  $\chi^2$  test). In addition, the recurrence ratio of high titer group against *Pg* SU63 was quite higher than that of normal titer group (P=0.083: Pearson's  $\chi^2$  test).

Recently, there have been reports that serum IgG antibody titer was useful for diagnosing periodontitis or judging treatment effects [7,8]. Also, it has been reported that the level of serum IgG antibody titer against *Pg* increases before

absorption of alveolar bone, and could predict the progression of periodontitis [9]. The results of this study indicate that serum IgG antibody titer might be useful as a predict marker of periodontitis recurrence.

Taken together, our findings indicate that higher serum IgG titer against obligate anaerobe even after active periodontal treatment is an important factor to predict the periodontitis recurrence and this approach will contribute to create the prognostic systems in periodontitis recurrence.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We greatly thank Scott Messenger at NASA Johnson Space Center for the revision of the manuscript and for encouragement in our research. This study was supported by Grant-in-Aid for Scientific Research (A) (No. 18209061) from the Japan Society for the Promotion of Science and Health and Labour Sciences Research Grants (Comprehensive Research on Aging and Health) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

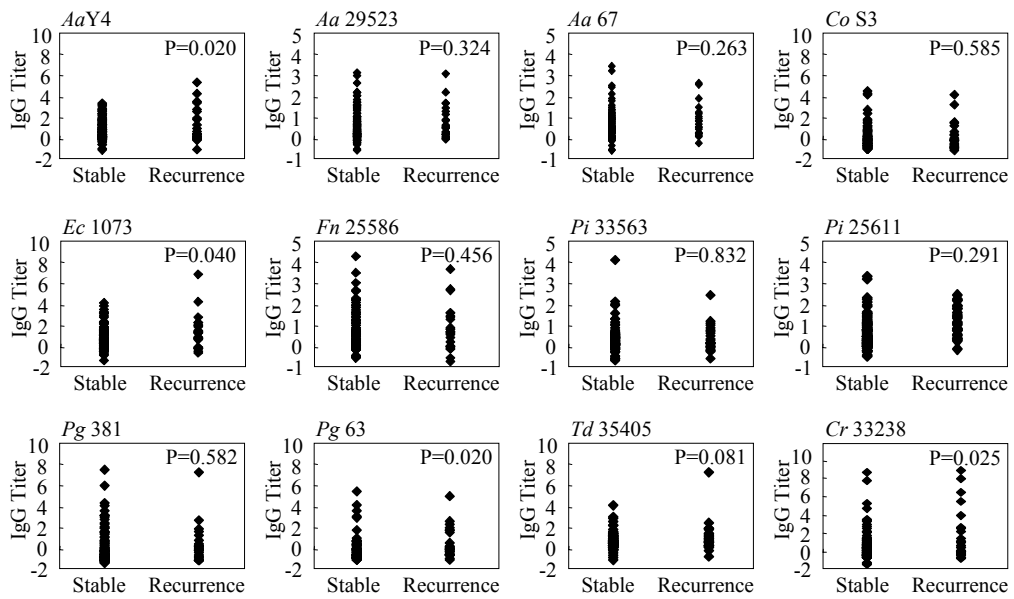
## REFERENCES

1. Listgarten MA, Loomer PM. Microbial identification in the management of periodontal diseases. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003; **8**: 182-192.
2. Takahashi K, Ohshima H, Kitanaka M, Sawa T, Mineshiba J, Nishimura F, Arai H, Takashiba S, Murayama Y. Heterogeneity of host immunological risk factors in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2001; **72**: 425-437.
3. Lamster IB, Kaluszner-Shapira I, Herrera-Abreu M, Sinha R, Grbic, JT. Serum IgG antibody response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: implications for periodontal diagnosis. *J Clin Periodontol* 1998; **25**: 510-516.
4. Sims TJ, Schifferle RE, Ali RW, Skaug N, Page RC. Immunoglobulin G response of periodontitis patients to *Porphyromonas gingivalis* capsular carbohydrate and lipopolysaccharide antigens. *Oral Microbiol Immunol* 2001; **16**: 193-201.
5. Aukhil I, Lopatin DE, Syed SA, Morrison EC, Kowalski CJ. The effects of periodontal therapy on serum antibody (IgG) levels to plaque microorganisms. *J Clin Periodontol* 1988; **15**: 544-550.
6. Levine M, LaPolla S, Owen WL, Socransky SS. Antibody-based diagnostic for 'refractory' periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002; **29**: 935-943.
7. Shapira L, Wilensky A, Kinane DF. Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J Clin Periodontol* 2005; **32**: 72-86.
8. Van Winkelhoff AJ, Boutaga K. Transmission of periodontal bacteria and models of infection. *J Clin Periodontol* 2005; **32**: 16-27.
9. Tolo K. Periodontal disease mechanisms in immunocompromised patients. *J Clin Periodontol* 1991; **18**: 431-435.

## FIGURE LEGEND

### **Figure 1. Levels of serum IgG antibody titer against 12 periodontal bacteria.**

The significant differences between “Stable” and “Recurrence” group were analyzed using the Mann-Whitney U test. Each dot represents an individual data tested by ELISA assay. The Y-axis in each panel denotes the value determined as [(serum IgG titer tested by ELISA) – (mean titer calculated using that of healthy subjects)] / (2SD calculated using that of healthy subjects).



**Table 1.** Clinical findings after periodontitis treatment and recurrence ratio during periodontal maintenance

	<i>Strains</i>	Examination	Normal IgG titer	High IgG titer	<i>P-Value</i>
Facultative anaerobic	<i>AaY4</i>	Patients number	104	35	
		Age (yr)	60.1 ± 10.7	64.0 ± 9.2	0.16
		Number of teeth	21.8	20	0.17
		PCR (%)	21.3	25.7	0.47
		BOP (%)	11.7	14.4	0.51
		Pocket depth (mm)	2.32	2.29	0.66
		Serum IgG Ab. Titer	0.079	2.51	<0.0001
		Recurrence ratio (%)	17.3	25.7	0.28
	<i>Aa ATCC29523</i>	Patients number	107	35	
		Age (yr)	61.2 ± 10.6	61.5 ± 10.3	0.92
Number of teeth		22.2	19.2	0.085	
PCR (%)		22.7	21.6	0.54	
BOP (%)		12.4	12.4	0.79	
Pocket depth (mm)		2.28	2.41	0.39	
Serum IgG Ab. Titer		0.11	2.69	<0.0001	
Recurrence ratio (%)		16.8	28.1	0.16	
<i>Ec FDC1073</i>	Patients number	82	57		
	Age (yr)	60.8 ± 10.4	61.6 ± 10.5	0.69	
	Number of teeth	22.1	20.2	0.064	
	PCR (%)	23.1	21.6	0.41	
	BOP (%)	12.4	12.2	0.63	
	Pocket depth (mm)	2.31	2.33	0.89	
	Serum IgG Ab. Titer	0.11	2.64	<0.0001	
	Recurrence ratio (%)	15.9	24.6	0.21	
Obligate anaerobic	<i>Pi ATCC25611</i>	Patients number	115	24	
		Age (yr)	61.3 ± 10.1	61.1 ± 12.5	0.93
		Number of teeth	21.6	20.2	0.49
		PCR (%)	22.3	23.3	0.84
		BOP (%)	12.2	13.7	0.51
		Pocket depth (mm)	2.31	2.39	0.24
		Serum IgG Ab. Titer	0.02	2.07	<0.0001
		Recurrence ratio (%)	15.8	36.1	0.021
	<i>Pg FDC381</i>	Patients number	100	39	
		Age (yr)	61.7 ± 10.5	60.1 ± 10.5	0.56
Number of teeth		21.8	20.2	0.43	
PCR (%)		23.1	21.3	0.39	
BOP (%)		12.4	12.4	0.99	
Pocket depth (mm)		2.29	2.38	0.59	
Serum IgG Ab. Titer		0.14	3.14	<0.0001	
Recurrence ratio (%)		19.1	20.5	0.84	
<i>Pg SU63</i>	Patients number	113	26		
	Age (yr)	61.8 ± 10.6	57.8 ± 9.3	0.18	
	Number of teeth	21.2	22.1	0.99	
	PCR (%)	24.2	12.4	0.29	
	BOP (%)	13.1	9.1	0.15	
	Pocket depth (mm)	2.31	2.33	0.95	
	Serum IgG Ab. Titer	0.004	3.13	<0.0001	
	Recurrence ratio (%)	16.8	36.1	0.083	
<i>Td ATCC35405</i>	Patients number	120	19		
	Age (yr)	61.1 ± 10.2	61.3 ± 12.3	0.88	
	Number of teeth	21.8	18.8	0.14	
	PCR (%)	23.3	17.8	0.24	
	BOP (%)	12.7	10.4	0.67	
	Pocket depth (mm)	2.33	2.23	0.22	
	Serum IgG Ab. Titer	0.21	2.31	<0.0001	
	Recurrence ratio (%)	16.7	36.8	0.039	
<i>Cr ATCC33238</i>	Patients number	100	39		
	Age (yr)	61.5 ± 10.1	60.6 ± 11.4	0.79	
	Number of teeth	22.1	19.9	0.22	
	PCR (%)	22.1	23.3	0.76	
	BOP (%)	11.8	13.6	0.65	
	Pocket depth (mm)	2.26	2.42	0.13	
	Serum IgG Ab. Titer	0.02	3.67	<0.0001	
	Recurrence ratio (%)	14.9	29.7	0.048	

Data were analysed by Mann-Whitney U test for clinical findings and Pearson's chi-square test for Recurrence ratio between Normal and High IgG titer group.



# 研究成果の刊行に関する一覧表



研究成果の一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sugiura Y et al.	Antimicrobial effects of the saliva substitute, Oral balance, against microorganisms from oral mucosa in the hematopoietic cell transplantation period.	Support Care Cancer			2008, in Press



# 研究成果の刊行物・別刷



## Antimicrobial effects of the saliva substitute, Oralbalance<sup>®</sup>, against microorganisms from oral mucosa in the hematopoietic cell transplantation period

Yuko Sugiura · Yoshihiko Soga · Ichiro Tanimoto ·  
Susumu Kokeguchi · Sachiko Nishide · Kotoe Kono ·  
Kanayo Takahashi · Nobuharu Fujii ·  
Fumihiko Ishimaru · Mitsune Tanimoto ·  
Kokoro Yamabe · Soichiro Tsutani ·  
Fusanori Nishimura · Shogo Takashiba

Received: 9 September 2007 / Accepted: 12 December 2007  
© Springer-Verlag 2007

### Abstract

**Goals** The commercially available saliva substitute Oralbalance<sup>®</sup> has been reported to alleviate symptoms of post-radiotherapy xerostomia in head and neck cancer patients. Oralbalance<sup>®</sup> may also be effective for xerostomia in patients undergoing hematopoietic cell transplantation (HCT) with high-dose chemotherapy and total-body irradiation. However, HCT patients are severely compromised, and saliva substitute must therefore not promote infection.

This study was performed to determine the effects of Oralbalance<sup>®</sup> on microbial species identified during HCT. **Patients and methods** Microbial identification of oral mucosa was performed in 28 patients undergoing HCT. The antimicrobial effects of Oralbalance<sup>®</sup> against bacteria and fungi detected in the HCT period were examined in vitro. Briefly, bacteria and fungi were spread on agar plates, and 0.1g of Oralbalance<sup>®</sup> gel was applied (about  $\phi$ 1cm). After incubation at 37°C for 24h, the presence of a

---

Y. Sugiura · Y. Soga · I. Tanimoto · K. Yamabe · S. Tsutani ·  
F. Nishimura · S. Takashiba (✉)  
Department of Pathophysiology–Periodontal Science,  
Okayama University Graduate School of Medicine,  
Dentistry and Pharmaceutical Sciences,  
2-5-1 Shikata-cho,  
Okayama 700-8525, Japan  
e-mail: stakashi@cc.okayama-u.ac.jp

S. Kokeguchi  
Department of Global Health and Environmental Sciences–Oral  
Microbiology, Okayama University Graduate School of Medicine,  
Dentistry and Pharmaceutical Sciences,  
Okayama, Japan

S. Nishide · K. Kono · K. Takahashi  
Department of Nursing, Okayama University Hospital,  
Okayama, Japan

N. Fujii · F. Ishimaru · M. Tanimoto  
Department of Hematology, Oncology and Respiratory Medicine,  
Okayama University Graduate School of Medicine,  
Dentistry and Pharmaceutical Sciences,  
Okayama, Japan

*Present address:*  
F. Nishimura  
Department of Dental Science for Health Promotion,  
Division of Cervico-Gnathostomatology,  
Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences,  
Hiroshima, Japan

*Present address:*  
S. Nishide  
Department of Nursing, Kagawa University Hospital,  
Kagawa, Japan

*Present address:*  
F. Ishimaru  
Okayama Red Cross Blood Center,  
Okayama, Japan

*Present address:*  
S. Tsutani  
Private Dental Office,  
Nara, Japan

transparent zone of inhibition around Oralbalance<sup>®</sup> was observed.

**Main results** Not only bacterial species constituting normal flora of the oral mucosa but also those not usually constituting normal flora, e.g., coagulase-negative *Staphylococcus*, were detected. A transparent zone was observed around Oralbalance<sup>®</sup> in all bacterial species examined. No transparent zone was observed for *Candida albicans*, but growth was inhibited in the area where Oralbalance<sup>®</sup> was applied.

**Conclusions** Oralbalance<sup>®</sup> does not facilitate increases in microorganisms in the HCT period. Oral care with Oralbalance<sup>®</sup> does not promote infection in patients undergoing HCT.

**Keywords** Hematopoietic cell transplantation · Xerostomia · Saliva substitute · Antimicrobial activity

## Introduction

High-dose chemotherapy and total-body irradiation, which are performed as the conditioning regimen of hematopoietic cell transplantation (HCT), are associated with xerostomia. Xerostomia not only results in uncomfortable oral dryness but also may cause the oral mucositis induced by chemotherapy and/or irradiation to be more severe because patients with xerostomia lose one of the most important factors in protecting the oral mucosa, saliva, which contains many components of the innate and acquired defense systems and not only eliminates microorganisms from the oral cavity [1, 8] but also moderates mechanical contact between the teeth and oral mucosa. Indeed, we often see the development of ulcerative mucositis on mucosa in contact with dry teeth clinically. Oral care using saliva substitute may alleviate the symptoms induced by xerostomia.

Oralbalance<sup>®</sup>, which is a commercially available saliva substitute, has been reported to alleviate the symptoms of post-radiotherapy xerostomia in head and neck cancer patients [7, 9]. Therefore, this product may be effective in HCT patients. However, as these patients are in a markedly compromised condition throughout the period of HCT, saliva substitute must not promote infection.

Therefore, the present study was performed to investigate the effects of the saliva substitute, Oralbalance<sup>®</sup>, on microbial species identified during HCT.

## Patients and methods

### Identification of microorganisms from oral mucosa

A total of 28 patients undergoing HCT at Okayama University Hospital (male, 17; female, 11;  $38.9 \pm 16.6$  years

old) were enrolled in this study. Microbial samples were obtained from oral mucosal swabs. Culture and identification of microorganisms were performed at the Central Clinical Laboratory of Okayama University Hospital. Microbial samples from mucosal swabs were plated onto brain heart infusion agar plate and cultured in aerobic condition at 37°C. Identification of obtained colonies was performed by rapid ID 32 STREP API<sup>®</sup>, rapid ID 32 E API<sup>®</sup> or ID 32 GN API<sup>®</sup> identification kits (Japan bioMerieux, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions. Microbial identification was performed three times (first: day -7 ~ -1; second: day 0 ~ +7; third: day +8 ~ +14) for each patient (a total of 84 examinations in 28 patients).

### Antimicrobial test of Oralbalance<sup>®</sup>

The antimicrobial effects of Oralbalance<sup>®</sup> against microbial species in the HCT period, with the exception of those detected only once throughout the total of 84 examinations of microorganisms, were examined in vitro. Antimicrobial tests were performed against the following standard strains: *Streptococcus sanguis* American Type Culture Collection (ATCC) 10556, *Streptococcus salivarius* Japan Collection of Microorganisms (JCM) 5707, *Neisseria mucosa* ATCC 19695, *Stomatococcus mucilaginosus* JCM 10910, *Staphylococcus epidermidis* National Institute of Technology and Innovation Biological Resource Center (NBRC) 12993, *Staphylococcus aureus* Food and Drug Administration 209, and *Candida albicans* NBRC 1385. Aliquots of these bacteria and fungi at concentrations of McFarland turbidity standard No. 0.5 were spread on brain heart infusion agar plates (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) or Sensitivity Disk Agar-N plates (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan). Then, 0.1g (about  $\phi 1$ cm) of Oralbalance<sup>®</sup> and an equal amount of Oralbalance<sup>®</sup> that had been pre-incubated at 90°C for 30min to denature the antimicrobial enzymes contained in the gel were applied separately to the same plates. Tetracycline disks for antimicrobial ability test (BD Sensi-Disk Tetracycline 30; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) or paper containing 100 $\mu$ g of amphotericin B (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) were also applied to the plates as positive controls. After incubation at 37°C in air for 24h, bacterial and fungal growth on the plates was examined.

## Results

### Microorganisms identified on the oral mucosa during HCT

The microorganisms identified on the oral mucosa during HCT are shown in Table 1. No samples were obtained during 13 of the 84 examinations because of the patients' conditions.  $\alpha$ - and  $\gamma$ -*Streptococcus* spp. (87.3% and



**Table 1** Microorganisms identified from the oral mucosa and detection frequency during HCT

Microorganism	Detection frequency (%)	Number (/71)
Bacterial components of the normal flora		
<i>α-Streptococcus</i> spp.	87.3	62
<i>γ-Streptococcus</i> spp.	29.6	21
<i>Neisseria</i> spp.	43.7	31
<i>Stomatococcus</i> spp.	23.9	17
Bacteria not usually found in the normal flora		
Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> spp.	46.5	33
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.8	2
<i>Haemophilus influenzae</i>	1.4	1
<i>Enterococcus</i> spp.	1.4	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1.4	1
<i>Bacillus</i> spp.	1.4	1
Fungi		
<i>Candida albicans</i>	5.6	4
<i>Torulopsis glabrata</i>	1.4	1

The microorganisms identified on the oral mucosa are shown. Microbial identification was performed three times (first: day -7 ~ -1; second: day 0 ~ +7; third: day +8 ~ +14) for each patient (total of 84 times for 28 patients). No samples were obtained during 13 of the 84 examinations because of the patients' conditions at these time points. Findings from 71 examinations are shown.

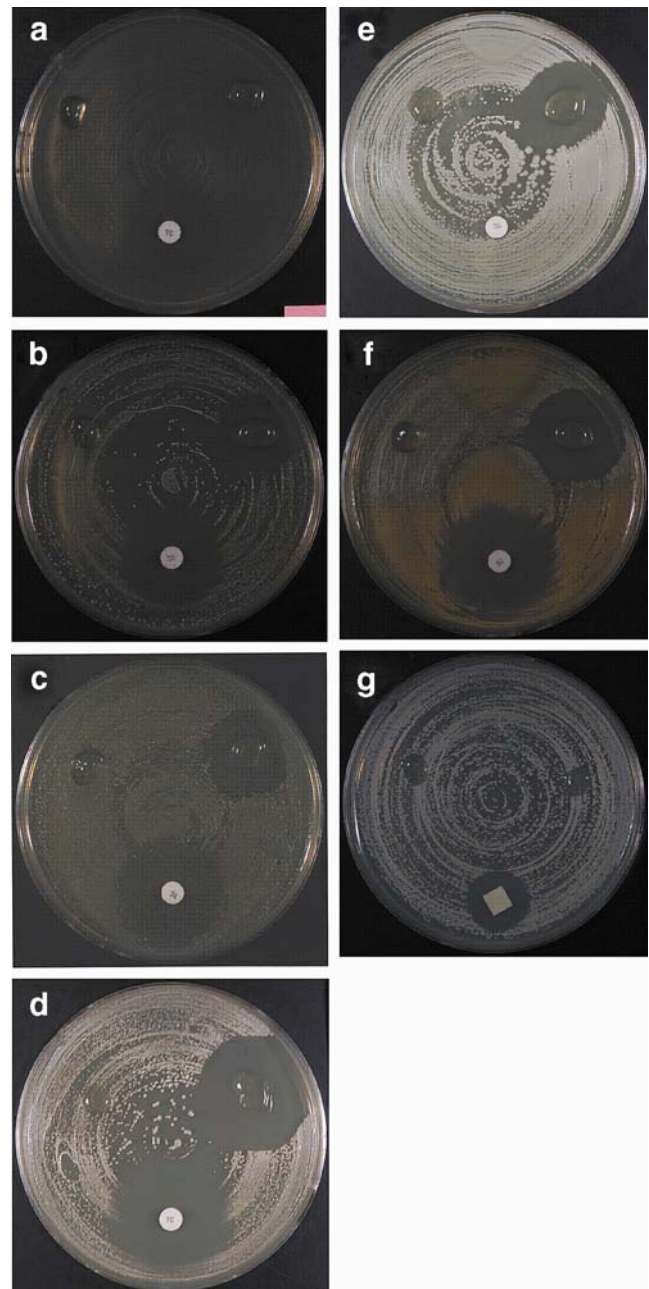
29.6%, respectively), *Neisseria* spp. (43.7%), and *Stomatococcus* spp. (23.9%), which are components of normal oral flora, were identified frequently. Coagulase-negative *Staphylococcus* spp. (CNS), which are not constituents of the normal flora, were also identified frequently (46.5%). The fungus, *C. albicans*, was identified at a frequency of 5.6%. *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus* spp., and *Torulopsis glabrata* were identified at low frequencies (1.4% ~ 2.8%).

#### Antimicrobial ability of Oralbalance®

The results of antimicrobial tests on Oralbalance® against *S. sanguis*, *S. salivarius*, *N. mucosa*, *S. mucilaginosus*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, and *C. albicans* are shown in Fig. 1. The presence of a transparent zone of inhibition was observed around Oralbalance® for all bacterial species examined. No such transparent zone was observed around heated Oralbalance®. With regard to fungi, although there was no transparent zone on *C. albicans* cultures, growth was inhibited in the area where Oralbalance® had been applied.

#### Discussion

The commercially available saliva substitute, Oralbalance®, showed antimicrobial activity against the bacterial species



**Fig. 1** Antimicrobial ability test of Oralbalance® against bacterial and fungal species isolated from patients during HCT. **a:** *Streptococcus sanguis*, **b:** *Streptococcus salivarius*, **c:** *Neisseria mucosa*, **d:** *Stomatococcus mucilaginosus*, **e:** *Staphylococcus epidermidis*, **f:** *Staphylococcus aureus*, and **g:** *Candida albicans*. Appearance of the entire plate surface; Oralbalance® was applied to the upper right portion of the plates. Heat-incubated Oralbalance® was applied to the upper left portion of the plates. Tetracycline disks (**a-f**) or paper containing amphotericin B (**g**) were applied to the lower part of the plates. There was a transparent zone of inhibition around Oralbalance® for all bacterial strains examined. Although there was no apparent transparent zone in *C. albicans* cultures, growth was inhibited in the area where Oralbalance® had been applied

detected during HCT. Against fungi, although there was no transparent zone observed on *C. albicans* cultures, growth was inhibited in the area where Oralbalance® had been applied in vitro. These results suggested that Oralbalance® would not contribute to the infection in patients undergoing HCT.

There have been some reports regarding the relationships between the bacteria that constitute the normal oral flora, e.g., *Streptococcus* species [6] and *Stomatococcus* species [2, 3], and bacteremia in neutropenic patients. In the present study, bacteria not usually seen in the normal flora in the oral mucosa, e.g., CNS, were also detected with high frequency during HCT, probably because bacterial substitution occurred due to the use of many antibiotics against infections in patients under neutropenic conditions. CNS is the bacterium isolated most frequently from blood cultures of febrile neutropenic patients [5]. The oral mucosa should be considered a potential source of organisms, including CNS, associated with bacteremia in immunocompromised patients [4]. In our in vitro studies, Oralbalance® did not facilitate an increase in such microorganisms related to bacteremia. The antibacterial effect of Oralbalance® is mainly due to antimicrobial enzymes of salivary origin, i.e., lactoperoxidase, lysozyme, and lactoferrin. Indeed, no transparent zone was observed around heat-incubated Oralbalance®. As Oralbalance® does not contain any antibiotics, it does not contribute to the appearance of antibiotic-resistant bacteria.

In conclusion, the saliva substitute, Oralbalance®, would not facilitate an increase in microorganisms during the HCT period.

**Acknowledgement** This study was supported by Grants-in-Aid for Cancer Research (H15–23) and Comprehensive Research on Aging and Health (H19–008) from the Ministry of Health, Labour and

Welfare and a Grant-in-Aid for Encouragement of Scientists (19925028) from the Japan Society for the Promotion of Science.

## References

1. Brandtzaeg P (1989) Salivary immunoglobulins. In: Tenovuo J (ed) Human saliva: clinical chemistry and microbiology, vol. II. CRC, Boca Raton, pp 1–54
2. Fanourgiakis P, Georgala A, Vekemans M, Daneau D, Heymans C, Aoun M (2003) Bacteremia due to *Stomatococcus mucilaginosus* in neutropenic patients in the setting of a cancer institute. Clin Microbiol Infect 9:1068–1072
3. Gruson D, Hilbert G, Pigneux A, Vargas F, Guisset O, Texier J, Boiron JM, Reiffers J, Gbikpi-Benissan G, Cardinaud JP (1998) Severe infection caused by *Stomatococcus mucilaginosus* in a neutropenic patient: case report and review of the literature. Hematol Cell Ther 40:167–169
4. Kennedy HF, Morrison D, Kaufmann ME, Jackson MS, Bagg J, Gibson BE, Gemmell CG, Michie JR (2000) Origins of *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus oralis* causing bacteraemia in a bone marrow transplant patient. J Med Microbiol 49:367–370
5. Kloos WE, Bannerman TL (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev 7:117–140
6. Richard P, Amador Del Valle G, Moreau P, Milpied N, Felice MP, Daeschler T, Harousseau JL, Richet H (1995) Viridans streptococcal bacteraemia in patients with neutropenia. Lancet 345: 1607–1609
7. Shahdad SA, Taylor C, Barclay SC, Steen IN, Preshaw PM (2005) A double-blind, crossover study of Biotene Oralbalance and BioXtra systems as salivary substitutes in patients with post-radiotherapy xerostomia. Eur J Cancer Care (Engl) 14:319–326
8. Tenovuo J (1998) Antimicrobial function of human saliva—how important is it for oral health. Acta Odontol Scand 56:250–256
9. Warde P, Kroll B, O'Sullivan B, Aslanidis J, Tew-George E, Waldron J, Maxymiw W, Liu FF, Payne D, Cummings B (2000) A phase II study of Biotene in the treatment of postradiation xerostomia in patients with head and neck cancer. Support Care Cancer 8:203–208