

*本内容は Applied Sciences, 13(6): 3893, 2023 に学術論文として掲載

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
2022年度 博士論文

非アルコール性脂肪肝炎由来肝細胞がん
と歯周病原細菌との関連に関する研究

2023年2月28日

琢磨 遼

Ryo Takuma

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
歯周病学分野

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
2022年度 博士論文

非アルコール性脂肪肝炎由来肝細胞がんと
歯周病原細菌との関連に関する研究

2023年2月28日

琢磨 遼

Ryo Takuma

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

歯周病学分野

小牧基浩教授 指導

論文内容要旨

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は最も一般的な慢性肝疾患であり、非アルコール性脂肪肝 (NAFL) と非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に分類される。前者はほとんど進行しないが、後者は進行性で肝硬変や肝細胞がん (HCC) へ進行する可能性がある。肥満や糖尿病などのメタボリックシンドロームの諸因子を背景に、NASH 由来 HCC (NASH-HCC) の発症率が年々増加している。これまでに、歯周病原細菌と NAFLD および消化器系がんの関連を示した報告はあるが、NASH-HCC と歯周病原細菌の関連は明らかにされていない。そこで本研究において、NASH および NASH-HCC 患者における口腔内細菌叢データを分析し、NASH-HCC に対する歯周病原細菌の関与について検討した。

横浜市立大学附属病院消化器内科に通院または入院し、本研究に対するインフォームドコンセントが得られた 20 歳以上の NASH 患者 40 名および NASH-HCC 患者 20 名を被験者として登録した。その後、問診、歯周病検査および検体採取 (唾液、洗口吐出液、末梢血) を行った。得られた試料を用いて内科的検査 (血液検査、肝機能検査)、歯周病原細菌に対する血清抗体価検査、唾液分泌速度・唾液中免疫グロブリン A (IgA) 濃度測定、および次世代シーケンシングにより唾液中細菌叢解析を行った。統計解析は群間比較に Mann-Whitney の U 検定を、相関分析には Spearman の順位相関係数を用いた。

被験者情報と生活習慣において、NASH-HCC 群の年齢は高く ($p=0.0003$)、BMI は低く ($p=0.015$)、年単位の歯科受診回数は多かった ($p=0.003$)。血液検査にお

いて、NASH-HCC 群のエンドトキシン ($p < 0.001$) と血糖値 ($p = 0.043$) が高かった。肝機能検査においては、NASH-HCC 群の総ビリルビンが高かった ($p = 0.015$)。歯周病検査の結果は 2 群間で同程度であった。細菌検査において、*Porphyromonas gingivalis* ($p = 0.034$) と *Fusobacterium nucleatum* ($p = 0.004$) に対する免疫グロブリン G 抗体価はいずれも NASH-HCC 群において高かった。唾液中総菌数に対する歯周病原細菌の比率は、NASH-HCC 群において *P. gingivalis* ($p = 0.377$) と *F. nucleatum* ($p = 0.01$) の比率が高かった。NASH 群において *Treponema denticola* 比率が高かった ($p = 0.014$)。また、唾液中細菌叢の Shannon index は NASH-HCC 群において低値であった ($p = 0.001$)。唾液分泌速度は 2 群間で同程度であったが、NASH-HCC 群における唾液中 IgA 濃度は低く ($p = 0.009$)、唾液中 IgA 分泌速度も遅かった ($p = 0.041$)。また、*F. nucleatum* 比率と唾液中 IgA 分泌速度には負の相関が認められた (相関係数: -0.30 , $p = 0.02$, $n = 60$)。

NASH-HCC 群においては、過去からの継続した感染歴と現在の細菌叢構成により、*P. gingivalis* と *F. nucleatum* に対する血清抗体価が高値になったと推測される。NASH-HCC 群で唾液中 IgA 分泌速度が低かった原因は、HCC を発症している被験者に免疫機能不全が生じ、その結果、唾液中 IgA 分泌速度が低下していた可能性が考えられる。唾液中 IgA は高病原性口腔内細菌と結合することにより、その病原性を制御し、正常な代謝活動を維持していることが知られている。以上より、口腔内の *P. gingivalis* と *F. nucleatum* が NASH から HCC への進行に関与している可能性、および *F. nucleatum* と唾液中 IgA の関連性が示唆された。

論文審査要旨

学位申請論文である「非アルコール性脂肪肝炎由来肝細胞がんと歯周病原細菌との関連に関する研究」は、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）および非アルコール性脂肪肝炎由来肝細胞がん（NASH-HCC）患者における口腔内細菌叢データを分析し、NASH-HCC の進行に歯周病原細菌である *P. gingivalis* と *F. nucleatum* が関与している可能性を検討した論文である。

非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は最も一般的な慢性肝疾患であり、非アルコール性脂肪肝（NAFL）と NASH に分類される。前者はほとんど進行しないが、後者は進行性で肝硬変や肝細胞がん（HCC）へ進行する可能性がある。肥満や糖尿病などのメタボリックシンドロームを背景に、NASH-HCC の発症率が年々増加している。このような背景から NASH-HCC と歯周病原細菌との関連を明らかにすることを目的とした新規性のある研究である。

研究は 20 歳以上の NASH 患者および NASH-HCC 患者を被験者として、問診、歯周病検査および検体採取（唾液、洗口吐出液、末梢血）を行い、内科的検査（血液検査、肝機能検査）、歯周病原細菌に対する血清抗体価検査、唾液分泌速度・唾液中 IgA 濃度測定、および次世代シーケンシングにより唾液中細菌叢解析を行った。統計解析は、群間比較に Mann-Whitney の U 検定と相関分析には Spearman の順位相関係数を用いている。研究テーマに対する研究方法の組み立ては論理的であり、適切な解析手法により実験が行われていると判断した。また、本研究は神奈川歯科大学研究倫理審査委員会の承認を得ており、倫理的配慮が

十分になされている。

結果として、被験者情報と生活習慣において、NASH群と比較してNASH-HCC群の年齢は高く、BMIは低く、歯科受診回数の多いことが判明した。血液検査と肝機能検査から成る内科的検査において、NASH群に比べてNASH-HCC群のエンドトキシン、血糖値および総ビリルビンが高く、ASTとALTはNASH群で高い傾向が確認された。歯周病検査の結果では2群間で同程度であったが、*Porphyromonas gingivalis*と*Fusobacterium nucleatum*に対するIgG抗体価はいずれもNASH群に比べてNASH-HCC群において高いことが確認された。唾液中総菌数に対する歯周病原細菌の比率もNASH-HCC群において*P. gingivalis*と*F. nucleatum*の比率が高く、NASH群において*Treponema denticola*の比率が高いことが確認された。また、唾液中細菌叢のShannon indexはNASH-HCC群において低値であった。唾液分泌速度は、2群間で同程度であったが、NASH-HCC群における唾液中IgA濃度は低く、唾液中IgA分泌速度も遅いことが明らかになり、*F. nucleatum*比率と唾液中IgA分泌速度には負の相関が認められた。これらの結果から、NASH-HCC群においては、過去からの継続した感染歴と現在の細菌叢構成により、*P. gingivalis*と*F. nucleatum*に対する血清抗体価が高値になったことが示唆された。NASH-HCC群で唾液中IgA分泌速度が低かった原因として、HCCを発症している被験者に免疫機能の低下が生じ、唾液中IgA分泌速度が低下していた可能性が考えられた。以上のことから、口腔内の*P. gingivalis*と*F. nucleatum*はNASHからHCCへの進行に関与している可能性とともに、*F. nucleatum*と唾液中IgAの関連が示唆

された。本研究は、症例より患者の内科的検査結果と口腔内細菌に対する検査結果から新しい知見を見出しており、その点も高く評価できる。

本審査委員会は、全ての教育課程を修了し、教育理念に相応しい成果が認められ、高度専門職としての豊かな学識を有すると判定されたことから、申請者が博士（歯学）の学位に十分値するものと認めた。

2023年2月28日

主 査：浜田 信城

副 査：小林 優

副 査：青木 一孝

緒 言

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は最も一般的な慢性肝疾患であり、非アルコール性脂肪肝 (NAFL) と非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に分類される^{1,2)}。前者はほとんど進行しないが、後者は進行性で肝硬変や肝細胞がん (HCC) へ進行する可能性がある³⁾。HCC の多くはウイルス性肝炎が原因であるが、近年は C 型肝炎に対する直接作用型抗ウイルス剤治療や B 型肝炎に対する核酸アナログ製剤治療により、発生率は徐々に減少している^{4,5)}。一方、肥満や糖尿病などのメタボリックシンドロームの諸因子を背景に、NASH 由来 HCC (NASH-HCC) の発症率が年々増加している⁶⁾。NASH の発症原因として、Multiple parallel hit theory が仮説として考えられている⁷⁾。しかしながら、NASH-HCC の発症機構は未だ明らかになっていない。

口腔内には大腸に次ぐ高い密度で細菌が棲息している。それらは病原細菌の定着阻止や免疫グロブリン A (IgA) 産生を誘導し、口腔内の恒常性を維持する役割を担っている^{8,9)}。しかしながら、口腔常在細菌のバイオフィームと宿主の免疫反応との間の複雑な相互作用が生じると、マイクロバイオームのディスバイオシスと宿主の炎症反応の調節異常を引き起こし、歯周炎が発症する^{9,10)}。歯周炎の軽微な慢性炎症は長期にわたるストレス応答を惹起し、それにより代謝異常と組織障害の悪循環が引き起こされ、メタボリックシンドロームの発症・増悪に関与すると考えられている⁹⁻¹²⁾。

歯周病は NAFLD の独立したリスク因子であり¹³⁾、NAFLD の肝線維化と有意に関連している¹⁴⁾。Qin らは肝硬変患者の腸内細菌叢を解析したところ、口腔由

来の細菌が疾患重症度と相関して高頻度に検出されたことを報告し¹⁵⁾、その後、口－腸－肝軸の概念が提唱された¹⁶⁾。歯周炎の主要な原因菌として知られる *Porphyromonas gingivalis* の NAFLD 患者唾液中における検出率は健常者と比較して有意に高く、NAFL、NASH と疾患が重症化するにつれて検出率が高くなることが示されている¹⁷⁾。Sato らは最近、NAFLD 患者における唾液中 *P. gingivalis* の陽性率(>0.01%)と肝硬変が有意に相関していることを明らかにしている¹⁸⁾。また、Furusho らは NASH 患者の肝臓組織の免疫組織化学染色で *P. gingivalis* の存在を報告している¹⁹⁾。これは *P. gingivalis* が歯周炎病巣より血中に入り、肝臓に達したためと推測されている。

疫学研究により、歯周病原細菌が全身の様々ながんの発生およびがん死のリスクを上げることが報告されている²⁰⁾。*P. gingivalis* は食道がん患者の食道細菌叢において増加しており²¹⁾、悪性度と相関している²²⁾。また、歯周病原細菌の1つである *Fusobacterium nucleatum* も食道、胃、大腸といった消化器系臓器のみならず乳がんの組織においても検出されている²³⁻²⁶⁾。最近、Komiya らは大腸がん組織に唾液中と同一菌株の *F. nucleatum* が保有されており、それが口腔内に由来することを明らかにしている²⁷⁾。一方、HCC においては、歯周炎を有する HCC 患者においては血中活性酸素種が高いなど²⁸⁾、わずかな報告があるのみである。とりわけ、NASH-HCC と歯周病原細菌の関連を調べた報告は未だなく、明らかでない。

我々は、NASH-HCC の発症には *P. gingivalis* と *F. nucleatum* が強く関与しているとの仮説を立てた。本研究の目的は、NASH および NASH-HCC 患者における

口腔内細菌叢データを分析し，NASH-HCC に対する歯周病原細菌の関与について検討することである。

実験対象および方法

1. 被験者

本研究は 2020 年 11 月から 2022 年 4 月の間に、横浜市立大学附属病院消化器内科に通院または入院していた 20 歳以上の NASH 患者と NASH-HCC 患者を対象とし、同病院歯科・口腔外科矯正歯科にて実施された。プロトコールは神奈川歯科大学研究倫理委員会の承認（承認番号 799）を得て、臨床試験データベースに登録された（UMIN-CTR No. UMIN000042754）。試験開始前に被験者に対して文書を基に本研究の目的、概要、安全性、個人情報保護について説明し、同意を得た。全ての手続きはヘルシンキ宣言の方針に従って行われた。

以下の条件に該当する者は本研究から除外した。

- 1) 歯周病検査時から 1 か月以内に抗菌薬を服用した者
- 2) 無歯顎の者

NASH 患者 46 名、NASH-HCC 患者 23 名を対象に検査を行い、口腔内検査、唾液検査、および血液検査を行えた被験者（NASH 患者 40 名、NASH-HCC 患者 20 名）のデータを解析に用いた。

2. 方法

- 1) 背景となる情報

年齢，性別，喫煙歴，1日の食事回数，1日の間食回数，1日の歯磨き回数，1回の歯磨き時間（分）および1年間の歯科受診回数はアンケート用紙を用いて被験者から聞き取り記録した。身長と体重は被験者のカルテから抽出し，ボディマス指数（BMI）を算出した。

2) 歯周病検査

歯周病検査は神奈川歯科大学歯学部歯周病学分野に所属する歯科医師2名が行った。プロービング深さとプロービング時の出血は各歯を6点法（頬側近心，頬側中央，頬側遠心，舌側近心，舌側中央，舌側遠心）で記録した。プラーク指数は各歯を4点法（近心，頬側，遠心，舌側）で記録された。歯の動揺度も全歯に対して調べられた。プロービングは圧が0.2Nになるよう設計されたプラスチック製プローブ（コンタクトプローブ，日本歯研工業株式会社，東京）を使用した。測定者は歯周病態顎模型（P15FE-500HPRO-S2A1-GSF，ニッシン，京都）を用いて事前にキャリブレーションを行った。

3) 唾液検査

唾液採取は2種類の方法で行った。唾液分泌速度や唾液中IgA濃度測定に用いる唾液はサリベット[®]（SARSTEDT, Germany）にて採取した。セットのポリプロピレン・ポリエチレン重合体製スポンジを被験者の舌下で2分間静置させ，その後唾液を含んだスポンジはチューブに戻した。唾液採取後，チューブは速や

かに氷冷し，遠心（1,200× g, 20 分, 4°C）後，解析に用いるまで−80°Cで保管した。

細菌叢解析に用いる唾液は被験者に 7.5 mL の生理食塩水で 10 秒間唾液と混ぜるように含嗽させ，その後に吐出液をチューブに回収して採取した。チューブは速やかに氷冷し，解析に用いるまで−80°Cで保管した。採取した唾液サンプルからの細菌DNA抽出，16S rRNA 遺伝子の増幅と MiSeq シークエンサー (Illumina, Inc., San Diego, USA) による塩基配列の解読および細菌叢解析はメディカルラボラトリー（株式会社サイキンソー，東京）にて行われた^{29,30}。

4) 血液検査

血液採取は横浜市立大学附属病院消化器内科で行われた。エンドトキシン，C 反応性タンパク（CRP），血糖値，Low Density Lipoprotein コレステロール（LDL-C），High Density Lipoprotein コレステロール（HDL-C），中性脂肪（TG），アスパラギン酸アミノ基転移酵素（AST），アラニンアミノ基転移酵素（ALT），γ-グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）および総ビリルビン（T-Bil）を解析した。血清の一部は Enzyme-linked Immunosorbent Assay（ELISA）法による解析に用いるまで−80°Cで保管した。

5) 唾液中 IgA 濃度測定

唾液中 IgA 濃度は Human IgA ELISA Kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA)

を用い、メーカーのプロトコールに従い通法通りに ELISA 法にて測定した。唾液中 IgA 分泌速度 ($\mu\text{g}/\text{min}$) は唾液中 IgA 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) と唾液分泌速度 (mL/min) の積から求めた。唾液分泌速度は唾液重量と採取時間から求めた。唾液の比重は 1.00 であると仮定した。

6) 歯周病原細菌血清抗体価測定

P. gingivalis と *F. nucleatum* の血清抗体価は、先行研究を参考に ELISA 法にて測定した³¹⁾。すなわち、96 穴マイクロプレートに光学密度 (OD) 1.0 に調整した *P. gingivalis* ATCC 33277 と *F. nucleatum* ATCC 25586 の菌液を固定した。一晩静置後、ブロッキング溶液 (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1 % ウシ血清アルブミン pH8.0) を各ウェルに加え、室温で 30 分ブロッキングを行った。その後、洗浄溶液 (50 mM Tris, 0.14M NaCl, 0.05% ポリソルベート 20, pH8.0) で 3 回洗浄し、5,000 倍希釈した血清を各ウェルに加えた。1 時間室温で静置後、洗浄溶液で 5 回洗浄し、10,000 倍希釈した Goat F(ab')₂ Anti-Human IgG(Fab')₂(HRP) (abcam, Cambridge, UK) を各ウェルに加えた。1 時間室温で静置後、洗浄溶液で 5 回洗浄し、3,3',5,5'-Tetramethyl -benzidine (TMB) 溶液を各ウェルに加えた。室温で 15 分遮光して静置後、反応停止液 (0.18M H₂SO₄) を加えて反応を停止した。吸光度はマイクロプレートリーダー (BioRad, Herchels, USA) にて 450 nm の波長で測定した。

7) 統計解析

統計解析は JMP version 12 software (SAS Institute Japan, 東京) を使用して行った。群間比較には Mann-Whitney の U 検定を用いた。相関分析には Spearman の順位相関係数を用いた。P<0.05 の場合を統計学的に有意差ありとした。

結 果

1. 被験者情報と生活習慣，歯周病検査

被験者情報と生活習慣の結果を表 1 に示す。NASH 群と比較して NASH-HCC 群における年齢は有意に高く ($p=0.0003$)，BMI は有意に低かった ($p=0.015$)。また，歯科受診回数は有意に多かった ($p=0.003$)。歯周病検査における全 7 項目は 2 群間で同程度であった (表 2)。

2. 細菌検査

表 3 は血清抗体価検査と唾液中の歯周病原細菌比率の結果を示す。NASH-HCC 群において，*P. gingivalis* ($p=0.034$) と *F. nucleatum* ($p=0.004$) に対する免疫グロブリン G (IgG) 抗体価は NASH 群に比べていずれも有意に高かった。

唾液中の総菌数に対する歯周病原細菌の比率は，NASH-HCC 群において *P. gingivalis* と *F. nucleatum* の比率が高く，*F. nucleatum* 比率は有意性を示した ($p=0.01$)。NASH 群において *Treponema denticola* 比率が有意に高かった ($p=0.014$)。また，唾液中細菌叢の Shannon index は NASH-HCC 群において有意に低値が認められた ($p=0.001$)。

3 内科的検査

血液検査と肝機能検査から成る内科的検査の結果が表 4 に示されている。血液検査において，NASH-HCC 群のエンドトキシン ($p<0.001$) と血糖値 ($p=0.043$) が NASH 群に比べ有意に高かった。肝機能検査においては，NASH 群よりも

NASH-HCC 群の T-Bil が有意に高かった ($p=0.015$)。

4. 唾液中 IgA 分泌速度および口腔内細菌比率との相関

唾液分泌速度と唾液中 IgA 濃度を調べることにより、唾液中 IgA 分泌速度が算出された。唾液分泌速度は NASH 群と NASH-HCC 群において同程度であった (図 1-A)。一方, NASH-HCC 群における唾液中 IgA 濃度は有意に低く ($p=0.009$) (図 1-B), 唾液中 IgA 分泌速度も有意に遅かった ($p=0.041$) (図 1-C)。

全被験者における唾液中 IgA 分泌速度と口腔内細菌比率および Shannon index との相関が表 5 に示されている。その結果, *F. nucleatum* 比率が唾液中 IgA 分泌速度と有意に相関していた ($p=0.02$)。

考 察

本研究は NASH-HCC と歯周病原細菌の関連を調べた初めての報告である。2 群の歯周病態は同程度であったが、NASH-HCC 患者における唾液中 *P. gingivalis* と *F. nucleatum* の比率は高く、それらに交叉する血清抗体価も高値であった。また、唾液中 *F. nucleatum* 比率と唾液中 IgA 分泌速度は負の相関を示した。

本研究の内科的検査における臨床検査項目の評価は、実施施設で採用している共用基準範囲（日本臨床検査標準協議会）に基づいて行われた³²⁾。NASH-HCC 群のエンドトキシンと血糖値は NASH 群よりも高かった。Alexopoulou らは、細菌感染によりそれらの数値が高くなることを報告しているが³³⁾、本研究においても同様であったのかもしれない。肝機能検査では GGT が両群とも基準範囲より高値であった。AST と ALT は両群とも基準範囲より高く、ALT は NASH 群でばらつきが大きかった。ばらつきの原因は、NASH 群には治療中の患者が含まれていたことによるものと考えられる。T-Bil は肝硬変や肝がんで高値となるため、NASH-HCC 群では基準範囲よりも高値であったと推察される³⁴⁾。以上より、2 群間で肝機能検査の一部に差はあるが、感染や炎症の状態では病的に大きな差は無かったことが示唆された。

NASH-HCC 群の被験者は年齢が高く、前述したように NASH 群よりも血糖値やエンドトキシンは高値であった。しかしながら、両群の歯周病検査の結果に差

は認められなかった。定期的なサポータティブペリオドンタルセラピーにより歯周病の状態は良好に維持されることが報告されている³⁵⁾。加えて、NASH-HCC 群では歯科受診の回数が多く、それは歯科専門職による歯周病管理をより多く受けていることを意味する。そのため、NASH-HCC 群においてマイクロバイアルシフトは起きたが、歯周病の重症化は防げている状態にあると考えられる。

本研究において我々は、次世代シーケンサーにより唾液中の歯周病原細菌比率を解析した。その結果、NASH 群と比較して NASH-HCC 群における唾液中 *P. gingivalis* と *F. nucleatum* の比率が高かった。このことは、NASH から HCC への進行にこれらの細菌が関与している可能性を示す。健常者、NAFLD、NASH と疾患が重症化するにつれ唾液中の *P. gingivalis* 検出率が高くなることが報告されている¹⁷⁾。本研究の結果は、NASH-HCC においても同様の関連があることを示す。また、Omura らは敗血症で亡くなった NASH 患者の静脈血と肝細胞から、*P. gingivalis* が検出されたことを報告している³⁶⁾。これは、NASH から肝硬変または HCC への進展における口腔内 *P. gingivalis* の重要性を示唆する。興味深いことに、NASH-HCC との関連を示した 2 種類の歯周病原細菌の内、*F. nucleatum* は他の様々な全身疾患とも関連していることが近年明らかになっている。免疫機構からの回避、がん遺伝子やがん抑制遺伝子への影響、細胞増殖の促進、およびがん細胞との接着機構等により、*F. nucleatum* は大腸がんを含む様々ながんの

発症や進行に関与している³⁷⁻³⁹⁾。また、広範な壊死と線維化を認める肝膿瘍で *F. nucleatum* が検出されたことも報告されている⁴⁰⁾。一方で、NASH-HCC 群における *T. denticola* 割合は低かった。*T. denticola* が検出された被験者は NASH 群の 57% に対し NASH-HCC 群では 35% と少なく、他菌種の比率増加に伴い低下したのかもしれない。

本研究において我々は、*P. gingivalis* と *F. nucleatum* に交叉する血清抗体価を測定した。*P. gingivalis* は歯周炎の発症や進行に関連する主要な病原細菌である⁴¹⁾。これまでに、マウスに高脂肪食を摂取させながら *P. gingivalis* を感染させると、血中 LPS 濃度が上昇し、肝臓を線維化させ NASH が進行することが明らかにされている¹⁹⁾。また、Ahn らは *P. gingivalis* 感染肥満マウスの肝臓では広範囲な小葉の炎症が観察され、ペルオキシソーム増殖剤活性化レセプター γ や脂肪酸トランスポーター CD36 を含む代謝調節因子が上昇することを報告している⁴²⁾。*F. nucleatum* は軽度の可逆性歯肉炎や進行した不可逆性歯肉炎など様々な歯周病に関与している⁴³⁾。これまで、この細菌は口腔内に偏在し、他の部位には通常存在しないか、ほとんど検出されないと考えられていたが⁴⁴⁾、がんとの関与を示す報告により現在では非常に重要視されている^{23-26,37)}。このように *P. gingivalis* と *F. nucleatum* は単独でも全身疾患に影響を与えることができる。それゆえ、本研究ではこれら 2 菌種を選択して血清抗体価を測定した。

我々のデータは、NASH 群に比べて NASH-HCC 群では *P. gingivalis* と *F. nucleatum* に交叉する血清抗体価が共に高いことを示した。*P. gingivalis* に交叉する血清抗体価は歯周炎の進行に関連している⁴⁵⁾。また、歯周炎患者の歯周病原細菌に交叉する血清抗体価は 30 カ月以上に渡って高値が続き、過去の感染歴を反映することが知られている⁴⁶⁾。一方、本研究で NASH-HCC 群の *F. nucleatum* 比率も高かった。Morozumi らは唾液中の歯周病原細菌の比率が高いと、その細菌に交叉する血清抗体価も高くなることを報告している⁴⁵⁾。それらから考察すると、過去からの継続した感染歴と現在の細菌叢構成から、*P. gingivalis* と *F. nucleatum* に対する血清抗体価は高値になったと推測される。

NASH 群と比較して、NASH-HCC 群の唾液中 IgA 濃度および分泌速度は低値であった。本研究における被験者の年齢中央値は、NASH 群が 60.8 歳、NASH-HCC 群が 78.5 歳であり、NASH-HCC 群の方が高齢であった。しかしながら、Miletic らは 60 代と 80 代の唾液中 IgA 分泌速度には差が無いことを報告している⁴⁷⁾。それゆえ、NASH-HCC 群の唾液中 IgA 分泌速度に対する加齢の影響は小さかったと考えられる。歯周病患者の唾液中 IgA 濃度は健常者よりも高いことが知られている⁴⁸⁾。一方、化学療法前および療法中の乳がん患者は健常者と比較して唾液中 IgA 分泌速度が低下していることが報告されている⁴⁹⁾。また、小児がん患者では抗がん剤治療の有無に関わらず唾液中 IgA 濃度は低下しており、がん

患者の唾液中 IgA 濃度低下は治療前から起きていることが報告されている⁵⁰⁾。その理由として、がん患者では代謝的、ホルモンのおよび免疫学的変化が生じ、免疫機能不全が起きているためと考えられている⁵⁰⁾。実際、全身的な免疫機能不全を生じる疾患である後天性免疫不全症候群（AIDS）患者では唾液中 IgA 濃度が低下している⁵¹⁾。がんと AIDS の免疫機能不全において共通しているのは T 細胞の疲弊である⁵²⁾。がんでは CD8+T 細胞の減少が免疫抑制を起し、AIDS では CD4+T 細胞が傷害を受けることで免疫抑制が起きる⁵¹⁾。マウスにおける実験で、CD4+T 細胞と CD8+T 細胞の減少により IgA+B 細胞数が減少することが報告されている⁵³⁾。それゆえ、HCC を発症している被験者においても IgA+B 細胞数減少を伴う免疫抑制が起きているのではないかと推測した。本研究において歯周病態は同程度であったが、これらの理由により NASH-HCC 群で唾液中 IgA 分泌速度が低かった可能性が考えられる。

唾液中 IgA 分泌速度と唾液中の各歯周病原細菌比率の相関を解析したところ、*F. nucleatum* との間に負の相関が認められた。唾液中 IgA は口腔内細菌に特異的に結合し、常在菌を決定する役割を担っている⁵⁴⁾。IgA ノックアウトマウスの口腔内ではグラム陽性菌である *Streptococcus* 属の減少と共に、グラム陰性で歯周病原細菌である *Aggregatibacter* 属、*Actinobacillus* 属および *Prevotella* 属が増加し、その結果として歯槽骨が減少し、破骨細胞が活性化することが報告されてい

る。それゆえ、唾液中 IgA は高病原性口腔内細菌と結合することでその病原性を制御し、正常な代謝活動を維持していると考えられている⁵⁵⁾。 *F. nucleatum* は *Prevotella* 属と同様にグラム陰性の歯周病原細菌であり、唾液中 IgA がその割合を制御している可能性がある。したがって、NASH-HCC 群における唾液中 *F. nucleatum* 比率の高値と唾液中 IgA 分泌速度の低値は関連していたと考えられる。すなわち、唾液中 IgA 分泌速度の低下により *F. nucleatum* が口腔内で増加する。それが NASH から HCC への進行に関与し、それによりさらに唾液中 IgA レベルが低下するといった悪循環が生じている可能性が示唆される。

細菌叢の多様性を表す Shannon index は、NASH-HCC 群において低値であった。歯周炎が重症でないグループは重度の歯周炎グループよりも唾液中細菌叢 Shannon index が低値であることが知られている⁵⁶⁾。また、肺がん患者の唾液中細菌叢 Shannon index は低値であることや⁵⁷⁾、放射線治療により歯肉縁下プラークの Shannon index は低下すること⁵⁸⁾がこれまでに報告されている。それゆえ、2 群間で歯周病状態が同程度であるにもかかわらず NASH-HCC 群で唾液中細菌叢の Shannon index が低値であった原因は、がん及びがんに対する治療等が影響したことによる可能性が考えられる。

本研究にはいくつかの限界がある。全体の被験者数が少なく、各群の被験者数にも差がある。このことは統計解析結果に影響する可能性がある。また、各群被

験者の治療ステージが揃っていないため、検査値に影響した可能性がある。加えて、解析対象となる細菌の種類が少なかった。多種類のデータがあれば、細菌間ネットワークなどより包括的な関与解明に寄与した可能性がある。

結 論

NASH-HCC 患者における唾液中 *P. gingivalis* と *F. nucleatum* の比率は高く、それらに交叉する血清抗体価も高値であった。以上より、口腔内の *P. gingivalis* と *F. nucleatum* が NASH から HCC への進行に関与している可能性、および *F. nucleatum* と唾液中 IgA の関連性が示唆された。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、多くのご指導を賜りました神奈川歯科大学歯学部臨床科学系歯科保存学講座歯周病学分野の小牧基浩教授、両角俊哉准教授ならびに短期大学部歯科衛生学科の山本裕子准教授に深く感謝申し上げます。また、本論文の作成に際し、適切なお助言を頂きました横浜市立大学大学院医学研究科肝胆膵消化器病学教室の米田正人准教授に深謝いたします。最後に、本研究の遂行にあたり終始多大なるご協力をいただいた横浜市立大学附属病院消化器内科ならびに歯科・口腔外科・矯正歯科の各位に感謝の意を表します。

本研究は JSPS 科研費 JP19K10454 の助成を受けて実施しました。

本研究の実施に際し、申告すべき利益相反はない。

文 献

1. Okanoue T, Umemura A, Yasui K *et al.*: Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in Japan. *J Gastroenterol Hepatol.* **26**(s1): 153-162, 2011.
2. European Association for the Study of the Liver, European Association for the Study of Diabetes, European Association for the Study of Obesity. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetologia.* **59**(6): 1121-1140, 2016.
3. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T *et al.*: Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology.* **116**(6): 1413-1419, 1999.
4. Zopf S, Kremer AE, Neurath MF *et al.*: Advances in hepatitis C therapy: What is the current state - what come's next? *World J Hepatol.* **8**(3): 139-147, 2016.
5. Koda M, Nagahara T, Matono T *et al.*: Nucleotide analogs for patients with HBV-related hepatocellular carcinoma increase the survival rate through improved liver function. *Intern Med.* **48**(1): 11-17, 2009.
6. Takuma Y, Nouse K: Nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma: our case series and literature review. *World J Hepatol.* **16**(12): 1436-1441, 2010.
7. Tilg H, Moschen AR: Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology.* **52**(5): 1836-1846, 2010.
8. Tolo K: Periodontal disease mechanisms in immunocompromised patients. *J Clin Periodontol.* **18**(6): 431-435, 1991.
9. Van Dyke TE: Pro-resolving mediators in the regulation of periodontal disease. *Mol*

Aspects Med. **58**: 21–36, 2017.

10. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN: Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers.* **3**: 17038, 2017.
11. Reynolds MA: Modifiable risk factors in periodontitis: at the intersection of aging and disease. *Periodontol 2000.* **64**(1): 7-19, 2014.
12. Knight ET, Liu J, Seymour GJ *et al.*: Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000.* **71**(1): 22-51, 2016.
13. Iwasaki T, Hirose A, Azuma T *et al.*: Correlation between ultrasound-diagnosed non-alcoholic fatty liver and periodontal condition in a cross-sectional study in Japan. *Sci Rep.* **8**(1): 7496, 2018.
14. Alazawi W, Benabe E, Tai D *et al.*: Periodontitis is associated with significant hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One.* **12**(12): e0185902, 2017.
15. Qin N, Yang F, Li A *et al.*: Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature.* **513**(7516): 59-64, 2014.
16. Acharya C, Sahingur SE, Bajaj JS: Microbiota, cirrhosis, and the emerging oral-gut-liver axis. *JCI Insight.* **2**(19): e9416, 2017.
17. Yoneda M, Naka S, Nakano K *et al.*: Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* **12**: 16, 2012.
18. Sato S, Kamata Y, Kessoku T *et al.*: A cross-sectional study assessing the relationship between non-alcoholic fatty liver disease and periodontal disease. *Sci Rep.* **12**(1): 13621, 2022.

19. Furusho H, Miyauchi M, Hyogo H *et al.*: Dental infection of *Porphyromonas gingivalis* exacerbates high fat diet-induced steatohepatitis in mice. *J Gastroenterol.* **48**(11): 1259-1270 2013.
20. Nwizu N, Wactawski-Wende J, Genco RJ. Periodontal disease and cancer: Epidemiologic studies and possible mechanisms. *Periodontol 2000.* **83**(1), 213-233, 2020.
21. Peters BA, Wu J, Pei Z *et al.*: Oral microbiome composition reflects prospective risk for esophageal cancers. *Cancer Res.* **77**(23): 6777-6787, 2017.
22. Gao S, Li S, Ma Z *et al.*: Presence of *Porphyromonas gingivalis* in esophagus and its association with the clinicopathological characteristics and survival in patients with esophageal cancer. *Infect Agent Cancer.* **11**: 3, 2016.
23. Yamamura K, Baba Y, Nakagawa S *et al.*: Human microbiome *Fusobacterium nucleatum* in esophageal cancer tissue is associated with prognosis. *Clin Cancer Res.* **22**(22): 5574-5581, 2016.
24. Boehm ET, Thon C, Kupcinkas J *et al.*: *Fusobacterium nucleatum* is associated with worse prognosis in Lauren's diffuse type gastric cancer patients. *Sci Rep.* **10**(1): 16240, 2020.
25. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS *et al.*: Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* **22**(2): 292-298, 2012.
26. Parhi L, Alon-Maimon T, Sol A *et al.*: Breast cancer colonization by *Fusobacterium nucleatum* accelerates tumor growth and metastatic progression. *Nat Commun.* **11**(1): 3259, 2020.
27. Komiya Y, Shimomura Y, Higurashi T *et al.*: Patients with colorectal cancer have identical strains of *Fusobacterium nucleatum* in their colorectal cancer and oral

- cavity. *Gut*. **68**(7): 1335-1337, 2019.
28. Tamaki N, Takai A, Tomofuji T *et al.*: Stage of hepatocellular carcinoma is associated with periodontitis. *J Clin Periodontol*. **38**(11): 1015-1020, 2011.
 29. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR *et al.*: Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. **37**(8): 852-857, 2019.
 30. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P *et al.*: The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. **41**: D590-596, 2013.
 31. Jinno S, Nakamura Y, Nagata M *et al.*: 1-Kestose consumption during pregnancy and lactation increases the levels of IgA in the milk of lactating mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. **78**(5): 861-866, 2014.
 32. 日本臨床検査標準協議会 基準範囲共用化委員会編：日本における主要な臨床検査項目の共用基準範囲－解説と利用の手引き－；2019/01/25 修正版：4-5, 2019. https://www.jccls.org/wp-content/uploads/2020/11/public_20190222.pdf, (参照 2023-01-26).
 33. Alexopoulou A, Agiasotelli D, Vasilieva LE *et al.*: Bacterial translocation markers in liver cirrhosis. *Ann Gastroenterol*. **30**(5): 486-497, 2017.
 34. Yuan Y, Yang F, Wang Y *et al.*: Factors associated with liver cancer prognosis after hepatectomy: A retrospective cohort study. *Medicine (Baltimore)*. **100**(42): e27378, 2021.
 35. Manresa C, Sanz-Miralles EC, Twigg J *et al.*: Supportive periodontal therapy (SPT) for maintaining the dentition in adults treated for periodontitis. *Cochrane Database*

Syst Rev. **1**(1): CD009376, 2018.

36. Omura Y, Kitamoto M, Hyogo H *et al.*: Morbidly obese patient with non-alcoholic steatohepatitis-related cirrhosis who died from sepsis caused by dental infection of *Porphyromonas gingivalis*: A case report. *Hepatol Res.* **46**(3): E210-E215, 2016.
37. Brennan CA, Garrett WS: *Fusobacterium nucleatum* - symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nat Rev Microbiol.* **17**(3): 156-166, 2019.
38. Chen S, Zhang L, Li M *et al.*: *Fusobacterium nucleatum* reduces METTL3-mediated m⁶A modification and contributes to colorectal cancer metastasis. *Nat Commun.* **13**(1): 1248, 2022.
39. Goradel NH, Heidarzadeh S, Jahangiri S *et al.*: *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: A mechanistic overview. *J Cell Physiol.* **234**(3): 2337-2344, 2019.
40. Hooshmand B, Khatib R, Hamza A *et al.*: *Fusobacterium nucleatum*: A cause of subacute liver abscesses with extensive fibrosis crossing the diaphragm, mimicking actinomycosis. *Germes.* **9**(2): 102-105, 2019.
41. Nakayama M, Ohara N: Molecular mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*-host cell interaction on periodontal diseases. *Jpn Dent Sci Rev.* **53**(4): 134-140, 2017.
42. Ahn J-S, Yang JW, Oh S-J *et al.*: *Porphyromonas gingivalis* exacerbates the progression of fatty liver disease via CD36-PPAR γ pathway. *BMB Rep.* **54**(6): 323-328, 2021.
43. Han YW: *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Curr Opin Microbiol.* **23**:141-147, 2015.
44. Aagaard K, Riehle K, Ma J *et al.*: A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS One.* **7**(6): e36466, 2012.
45. Morozumi T, Nakagawa T, Nomura Y *et al.*: Salivary pathogen and serum antibody

- to assess the progression of chronic periodontitis: a 24-mo prospective multicenter cohort study. *J Periodontol Res.* **51**(6): 768-778, 2016.
46. Papapanou PN, Neiderud AM, Disick E *et al.*: Longitudinal stability of serum immunoglobulin G responses to periodontal bacteria. *J Clin Periodontol.* **31**(11): 985-990, 2004.
 47. Miletic ID, Schiffman SS, Miletic VD *et al.*: Salivary IgA secretion rate in young elderly persons. *Physiol Behav.* **60**(1): 243-248, 1996.
 48. Bachrach G, Muster Z, Raz I *et al.*: Assessing the levels of immunoglobulins in the saliva of diabetic individuals with periodontitis using checkerboard immunodetection. *Oral Dis.* **14**(1): 51-59, 2008.
 49. Harrison T, Bigler L, Tucci M *et al.*: Salivary sIgA concentrations and stimulated whole saliva flow rates among women undergoing chemotherapy for breast cancer: an exploratory study. *Spec Care Dentist.* **18**(3): 109-112 1998.
 50. Guerra RN, Oliveria-Junior JJ, Mouchrek-Filho JC *et al.*: Salivary evaluation of pediatric patients with cancer, before and after antineoplastic treatment. *J Oral Pathol Med.* **41**(7): 527-532, 2012.
 51. Challacombe SJ, Sweet SP: Oral mucosal immunity and HIV infection: current status. *Oral Dis.* **8**(S2): 55-62, 2002.
 52. Vigano S, Bobisse S, Coukos G, Perreau M, Harari A: Cancer and HIV-1 infection: Patterns of chronic antigen exposure. *Front Immunol.* **11**: 1350, 2020.
 53. Lopez MC, Colombo LL, Huang DS, Watson RR: Suppressed mucosal lymphocyte populations by LP-BM5 murine leukemia virus infection producing murine AIDS. *Reg Immunol* **4**(3), 162-167, 1992.
 54. Carpenter GH: Salivary factors that maintain the normal oral commensal microflora.

J Dent Res. **99**(6): 644-649, 2020.

55. Chang E, Kobayashi R, Fujihashi K *et al*: Impaired salivary SIgA antibodies elicit oral dysbiosis and subsequent induction of alveolar bone loss. *Inflamm Res.* **70**(1): 151-158, 2021.
56. Toyoma N, Ekuni D, Yokoi A *et al.*: Features of the oral microbiome in Japanese elderly people with 20 or more teeth and a non-severe periodontal condition during periodontal maintenance treatment: A cross-sectional study. *Front Cell Infect Microbiol.* **12**: 957890, 2022.
57. Vogtmann E, Hua X, Yu G *et al.*: The oral microbiome and lung cancer risk: An analysis of 3 prospective cohort studies. *J Natl Cancer Inst.* **114**(11): 1501-1510, 2022.
58. Gao L, Hu Y, Wang Y *et al.*: Exploring the variation of oral microbiota in supragingival plaque during and after head-and-neck radiotherapy using pyrosequencing. *Arch Oral Biol.* **60**(9): 1222-1230, 2015.

付図説明

図 1-A. 唾液分泌速度

唾液重量と採取時間から唾液分泌速度 (mL/min) を求めた。示された数値は中央値 (第 1 四分位数－第 3 四分位数) であり, 統計解析には Mann-Whitney の U 検定が用いられた。

図 1-B. 唾液中 IgA 濃度

ELISA 法にて唾液中 IgA 濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を測定した。示された数値は中央値 (第 1 四分位数－第 3 四分位数) であり, 統計解析には Mann-Whitney の U 検定が用いられた。

図 1-C. 唾液中 IgA 分泌速度

唾液中 IgA 濃度と唾液分泌速度の積から唾液中 IgA 分泌速度 ($\mu\text{g/min}$) を求めた。示された数値は中央値 (第 1 四分位数－第 3 四分位数) であり, 統計解析には Mann-Whitney の U 検定が用いられた。

表 1. 被験者情報と生活習慣

	NASH 群 (N=40)	NASH-HCC 群 (N=20)	<i>P</i> 値
性別 (女/男)	18/22	6/14	0.26
喫煙 (非喫煙者/喫煙者)	9/31	4/16	0.824
年齢 (歳)	60.5 (55-70)	78.5 (65-81.8)	0.0003
BMI	27.5 (25.8-31.1)	25.8 (22.2-31.5)	0.015
1 日の食事回数	3 (3-3)	3 (3-3)	0.213
1 日の間食回数	1 (0-2)	1.5 (1-2.8)	0.383
1 日の歯磨き回数	2 (1-2)	2 (2-2)	0.813
1 回の歯磨き時間 (分)	3 (3-5)	4 (3-5)	0.18
歯科受診回数 (回/年)	0 (0-2)	2 (0.7-4)	0.003

BMI; ボディマス指数。性別と喫煙における数値は各人数を示し、 χ^2 検定により統計解析が行われた。その他項目における数値は中央値 (第 1 四分位数-第 3 四分位数) であり、統計解析には Mann-Whitney の U 検定が用いられた。

表 2. 歯周病検査

	NASH 群 (N=40)	NASH-HCC 群 (N=20)	<i>P</i> 値
残存歯数	26 (21-28)	25 (19.5-26.8)	0.332
プロービング深さ (mm)	2.9 (2.6-3.2)	2.9 (2.6-3.2)	0.856
プロービング時の出血 (%)	15.0 (10.7-30.9)	15.2 (7.1-30.6)	0.466
歯の動揺度	0 (0-0.6)	0 (0-0.1)	0.507
プラーク指数	0.9 (0.7-1.4)	0.9 (0.7-1.4)	0.807
歯周炎症表面積 (mm ²)	234 (141-380)	194 (86-506)	0.402
ポケット上皮表面積 (mm ²)	1355 (1174-1654)	1306 (938-1494)	0.236

示された数値は中央値（第 1 四分位数－第 3 四分位数）であり，統計解析には Mann-Whitney の U 検定が用いられた。

表 3. 細菌検査

	NASH 群 (N=40)	NASH-HCC 群 (N=20)	P 値
血清抗体価			
<i>P. gingivalis</i> IgG 抗体価 (EU)	0.09 (0.05-0.18)	0.18 (0.11-0.26)	0.034
<i>F. nucleatum</i> IgG 抗体価 (EU)	0.01 (0-0.03)	0.04 (0.02-0.09)	0.004
唾液中歯周病原細菌比率			
<i>P. gingivalis</i> 比率 (%)	0.03 (0-1.25)	0.46 (0-0.69)	0.377
<i>T. forsythia</i> 比率 (%)	0.14 (0.06-0.35)	0.07 (0.02-0.31)	0.391
<i>T. denticola</i> 比率 (%)	0.05 (0-0.2)	0 (0-0.03)	0.014
<i>F. nucleatum</i> 比率 (%)	0.14 (0-0.35)	0.35 (0-0.61)	0.01
<i>P. intermedia</i> 比率 (%)	0 (0-0.33)	0 (0-0.23)	0.747
Shannon index	6.75 (6.51-7.14)	6.42 (6.04-6.64)	0.001

示された数値は中央値（第 1 四分位数－第 3 四分位数）であり，統計解析には Mann-Whitney の U 検定が用いられた。

表 4. 内科的検査

	NASH 群 (N=40)	NASH-HCC 群 (N=20)	<i>P</i> 値
血液検査			
エンドトキシン (EU)	0.13 (0.08-0.2)	0.21 (0.16-0.28)	<0.001
CRP (mg/dL)	0.14 (0.09-0.44)	0.15 (0.07-0.5)	0.728
血糖値 (mg/dL)	118 (101-153)	140 (122-163)	0.043
LDL コレステロール (mg/dL)	109 (93-131)	104 (90-135)	0.775
HDL コレステロール (mg/dL)	56 (45-60)	53.5 (50.3-60.8)	0.922
中性脂肪 (mg/dL)	154 (103-267)	122 (71-283)	0.277
肝機能検査			
AST (U/L)	50.5 (26.3-62)	38 (29-65.5)	0.826
ALT (U/L)	51.5 (25.3-71.8)	32 (24-54.5)	0.163
GGT (U/L)	65 (36.3-126)	66.5 (49.5-111.3)	0.683
総ビリルビン (mg/dL)	0.8 (0.6-1)	1.3 (0.75-1.7)	0.015

AST; アスパラギン酸アミノ基転移酵素, ALT; アラニンアミノ基転移酵素, GGT; γ -グルタミルトランスフェラーゼ。示された数値は中央値（第 1 四分位数－第 3 四分位数）であり，統計解析には Mann-Whitney の U 検定が用いられた。

表 5. 唾液中 IgA 分泌速度と口腔内細菌比率との相関

	唾液中 IgA 分泌速度 ($\mu\text{g}/\text{min}$)		
	相関係数	P 値	N
<i>P. gingivalis</i> (%)	0.07	0.60	60
<i>T. forsythia</i> (%)	0.03	0.80	60
<i>T. denticola</i> (%)	0.03	0.80	60
<i>F. nucleatum</i> (%)	-0.30	0.02	60
<i>P. intermedia</i> (%)	0.13	0.30	60
Shannon index	0.003	0.98	60

統計解析にはスピアマンの順位相関係数が用いられた。

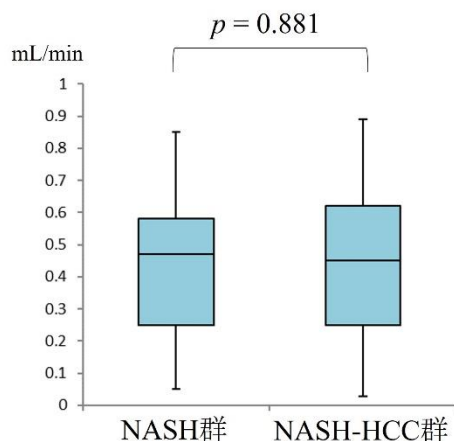


図 1-A. 唾液分泌速度

唾液重量と採取時間から求めた。

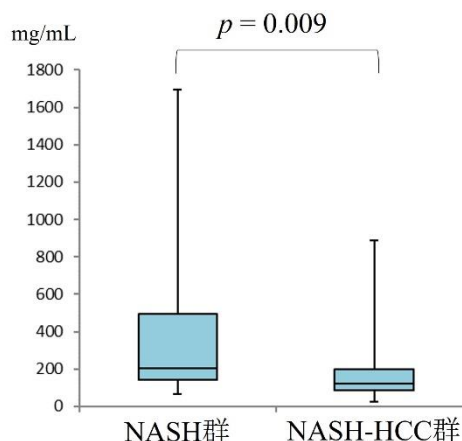


図 1-B. 唾液中 IgA 濃度

ELISA 法にて測定した。

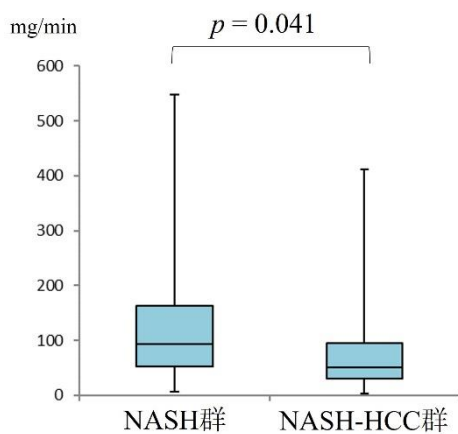


図 1-C. 唾液中 IgA 分泌速度

唾液分泌速度と唾液中 IgA 濃度の積から求めた。

いずれも示された数値は中央値（第 1 四分位数－第 3 四分位数）であり，統計解析には Mann-Whitney の U 検定が用いられた。