

## 鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

## 内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍)	中山 亮子(福岡県)
博士の専攻分野	博士(歯学)
学位記番号	乙第270号
学位授与年月日	令和2年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Effect of gummy candy containing ubiquinol on secretion of saliva: A randomized, double-blind, placebo-controlled parallel-group comparative study and an in vitro study (ユビキノール含有グミの唾液分泌に対する効果の検討: 無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較 試験と in vitro 試験による解析) PLOS ONE 第14巻, 4号 e0214495 頁掲載 平成31年4月3日発行
論文審査委員	主査 教授 奥村 敏 副査 教授 山越 康雄 副査 教授 斎藤 一郎

## 内容の要旨

## 【緒言】

唾液は種々の生理活性物質等を含み口腔の機能の維持だけでなく、全身の生体防御や恒常性の維持に不可欠な外分泌液である。この唾液分泌は概日リズムにより調節されているが、増齡的な体内時計の変調や筋力の低下等様々な要因により分泌量の減少が生じ、特に高齢者では誤嚥性肺炎などのリスクを上げることから唾液分泌機能の維持は超高齡化社会において不可欠である。一方、ユビキノールはミトコンドリア呼吸鎖における ATP 産生の役割を担う補酵素であり、主要な抗酸化物質の一つとしても知られており、加齡と共にユビキノールの体内量が減少することから高齢者に多い唾液分泌障害との関連が従来示唆されている。このことから本研究ではこのユビキノールによる唾液分泌に対する効果の検討を目的とし、健常者を対象とした臨床試験とその作用機序を解析した。

## 【方法と結果】

臨床試験は鶴見大学歯学部倫理審査委員会および利益相反委員会により承認され(第1428号)、ヘルシンキ宣言の原則に従い実施した。健常者40名を対象とし、ユビキノール含有のグミによる唾液分泌に与える効果を評価するため、CONSORT2010に準じた無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を行なった。被験者は無作為に2群に割付けされ、1粒にユビキノール50mgを含有するグミまたはプラセボを1日1回朝食後に2粒(ユビキノール含量計100mgまたは0mg)の摂取を8週間継続した。評価は試験前後の唾液量、ユビキノールの体内循環量を反映する唾液中ユビキノール濃度、RSST(反復唾液嚥下テスト)、咬合力検査および自覚症状に関する78問の問診票(5点スケールでの回答)を解析した。統計学的手法はパラメトリックデータに対し Student の t 検定または対応のある t 検定を、ノンパラメトリックデータの場合はペア群に対し Mann-Whitney U 検定と独立群に対し Wald-Wolfowitz のラン検定を適用し、効果量(2群間の平均差)はCohenのd値として求めた。ユビキノール摂取群は試験前後で唾液中のユビキノール濃度は約5倍( $p=0.00956^{**}$ ,  $d=0.7$ )となり、唾液分泌量も有意に増加した( $p=0.00963^{**}$ ,  $d=0.45$ )。RSSTはユビキノールとの相関はなく群間の差もなかったが( $p=0.163$ ,  $d=-0.097$ )、咬合力はユビキノールによって増加傾向を認めた(右: $p=0.093$ ,  $d=0.54$  左: $p=0.0038^{**}$ ,  $d=0.49$ )。自覚症状ではユビキノール群の試験前後の比較により「疲労感」( $p=0.00506^{**}$ ,  $d=-0.726$ )、「口渇」( $p=0.04799^{*}$ ,  $d=-0.648$ )、「風邪をひきやすい」( $p=0.00577^{**}$ ,  $d=-0.855$ )、および「下痢」( $p=0.0166^{*}$ )で有意な改善が見られた。

in vitro 試験にはヒト顎下腺導管上皮細胞に由来する HSG 細胞を使用した。

ATP 産生能の測定のため HSG 細胞をユビキノール含有 (1, 10, 100 nM) と非含有 (0 nM) の培地で 48 時間培養後, ATP アッセイ試薬を添加しその蛍光強度を測定した. その結果, HSG 細胞をユビキノールで作用すると, 濃度依存的に有意な ATP の増加を示した (0 ~ 100 nM ;  $p < 0.05^*$ ).

ユビキノールの脂質過酸化に対する影響を検討する目的で, マロンジアルデヒド (MDA) を TBARS 法により定量した. HSG 細胞をユビキノール (1, 10, 100 nM) あるいは抗酸化効果の対照として 100  $\mu$ M アスコルビン酸ナトリウムを含む培地に交換し 1 時間培養の後, 酸化剤として  $\text{FeSO}_4$  を最終濃度 100  $\mu$ M で添加 30 分間培養した. 処理した細胞を超音波破碎して得られた遠心上清をサンプルとした. サンプル中の MDA と試薬中の TBA が形成した MDA-TBA2 付加体を分光光度計で 400 ~ 700 nm の吸光スペクトル (分解能 1 nm) を測定し, 3 次微分解析を行うことで検出した. その結果, HSG 細胞は  $\text{FeSO}_4$  への曝露により酸化ストレスが誘導されると, 脂質過酸化により MDA が増加したが, 1 nM 以上のユビキノールの存在下では MDA の生成が有意に抑制された ( $p=0.026^*$ ).

タンパク質への抗酸化効果を検出するため, ユビキノールの存在下または非存在下で 1 時間培養された HSG 細胞に終濃度 20 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加し酸化ストレス下でさらに 30 分間培養した. 処理した細胞は超音波破碎し, その遠心上清に対して 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) を終濃度 10 mM で添加してカルボニル基の誘導体化を行なった. その後サンプルは SDS-PAGE で分離し PVDF メンブレンに転写し, メンブレン上のカルボニル化タンパク質は抗 DNP 抗体および発光試薬で検出し DNP に関連する化学発光の強度を Image J ソフトウェアを使用して定量化した結果,  $\text{H}_2\text{O}_2$  処理により HSG 細胞に誘導されたタンパク質酸化 (カルボニル化) のユビキノールによる抑制が観察された.

#### 【考 察】

ユビキノール含有グミの摂取により健常者の唾液分泌量が有意に増加し, 加えて唾液中ユビキノール濃度も同様に増加したことから, 経口摂取したユビキノールが唾液分泌を亢進させることが示唆された. 咬合力はユビキノールにより増加傾向が認められたものの, RSST に対する効果は明らかでなかった. これらの結果からユビキノール群での唾液分泌の増加は口腔周囲筋に対する効果ではなく, 唾液腺に対する直接的な作用によるものと考えられた. 自覚症状は, ユビキノール群で 4 つの症状, 「疲労感」, 「口渇」, 「風邪をひきやすい」, 「下痢」の大幅な改善を示し, これらはユビキノールによる慢性疲労症候群の改善に関する従来の報告と一致した. 女性の被験者の多くは閉経の平均年齢の 5 歳前後であり, 唾液の分泌量が年齢と有意な逆相関を示したことから, 抗酸化活性のあるエストロゲンの減少が酸化ストレスを増加させ唾液腺機能の障害を引き起こす可能性が示唆されたが, ユビキノール摂取群ではこの障害を補うような改善が示された. *in vitro* 試験の結果, ユビキノールは唾液腺細胞の酸化ストレスによる障害を抑制し ATP 産生を増加させた. これらのことより, ユビキノールには健常者の円滑な唾液分泌効果が示唆され, その作用機序としては ATP による ATP 依存性イオンポンプの活性化や, 唾液腺組織内の活性酸素種の消去により過酸化脂質の生成やタンパク質の酸化修飾を抑制して酸化ストレスを軽減する効果が想定された.

#### 【結 語】

本研究の結果よりユビキノールに唾液分泌促進効果が確認され, 口腔乾燥症の治療や予防に対する有効性が示唆された.

#### 審査の結果の要旨

中山亮子氏は, ユビキノールによる唾液分泌に対する効果を解明するため, 健常者を対象とした臨床試験とヒト顎下腺導管上皮細胞である Human salivary gland cell (HSG) 細胞を用いた *in vitro* 試験を行った.

1) 臨床試験: 健常者を対照群 (20 名) とユビキノール摂取群 (20 名) に分け, 前者にはユビキノール非含有グミ, 後者にはユビキノール含有 (100 mg/day) グミの投与を行った. 投与開始 8 週後に唾液分泌量 (Saxon test), 唾液中ユビキノール濃度, RSST (反復唾液嚥下テスト), 咬合力, 自覚症状に関する問診票 (5 点スケール) を指標にユビキノールの唾液分泌に及ぼす効果を評価した. その結果ユビキノール摂取群では, 摂取前に比べて唾液分泌量, 唾液中ユビキノール濃度, 咬合力の増加と自覚症状 (疲労感, 口渇, 風邪をひきやすい, 下痢) の改善効果が観察された.

#### 2) In vitro 実験:

2-1) ATP 産生への影響: Adenosine triphosphate (ATP) は唾液腺からの唾液分泌を促進する. ユビキノール含有培地で HSG 細胞を培養後の ATP 産生能を調べたところ, 濃度依存性に増加することが確認された.

2-2) 酸化ストレスへの抑制効果: 酸化剤 ( $\text{FeSO}_4$ ) 処理による HSG 細胞内での Malondialdehyde (MDA) 産生が, ユビキノールにより濃度依存性に抑制されることが確認された. また酸化剤 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 処理による HSG 細胞内でのカルボニル化

タンパク (DNP) 産生がユビキノール処理により抑制されることも確認された。

本研究は、ユビキノールが口腔乾燥症治療への有効性を示唆する貴重な研究である。

よって、本論文は博士 (歯学) の学位論文として十分な価値を有するものと判断した。